

Identifizierung und Charakterisierung neuer Protein- Interaktionspartner der humanen lncRNA PANDAR

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Nicole Pospiech (geb. Meißner)
geboren in Bochum
Juni 2016

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Chemical Genomics Centre der Max Planck Gesellschaft in der Arbeitsgruppe von Dr. Sven Hennig in Dortmund durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Verena Jendrossek
2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Schramm

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hemmo Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 23.09.2016

„Durch Wissenschaft wird bewiesen, durch Intuition aber entdeckt.“

Jules Henri Poincaré (1854-1912)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis.....	10
Formelverzeichnis	11
1. Einleitung	13
1.1 Non-coding RNA	13
1.2 Funktionen der lncRNAs.....	15
1.3 lncRNA: Mechanismen der Genregulation.....	18
1.4 Bindedomänen der RNA-Protein Interaktionen	20
1.5 lncRNA-assoziierte Erkrankungen	23
1.6 lncRNA <i>PANDAR</i>	25
1.7 Nuklear Transkription Faktor Y	29
2. Zielsetzung	31
3. Material und Methoden	32
3.1 Material	32
3.1.1 Geräte	32
3.1.2 Materialien	33
3.1.3 Puffer.....	38
3.2. Methoden.....	43
3.2.1 Zellkultur	43
3.2.1.1 Kultivierung der Zellen.....	43
3.2.1.2 Einfrieren von Zellen	43
3.2.1.3 Auftauen von Zellen.....	43
3.2.1.4 Ermittlung der Zellzahl	44
3.2.1.5 Transiente und stabile DNA-Transfektion.....	44
3.2.1.6 siRNA-Knockdown.....	44
3.2.1.7 Doxorubicin Behandlung	45
3.2.1.8 Zellviabilitäts- und Zellproliferations-Assay (WST-1 und Kristallviolett)	45
3.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	45
3.2.2.1 RNA Isolierung und Aufreinigung	45
3.2.2.2 cDNA Synthese.....	46
3.2.2.3 quantitative Real Time PCR	46
3.2.2.3.1 Statistische Auswertung biologischer Triplikate	47

3.2.2.4 <i>In vitro</i> Transkription	48
3.2.2.5 <i>In vitro</i> Transkription von Biotin-RNA	49
3.2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	49
3.2.2.7 Kolonie-PCR	50
3.2.2.8 Agarose-Gele und Extraktion der DNA-Fragmente	51
3.2.2.9 Klonierung	51
3.2.2.9.1 Gateway	51
3.2.2.9.2 Restriktion-Ligation	52
3.2.2.9.3 Sequence independent ligation cloning (SLIC)	52
3.2.2.10 Transformation und Präparation des Plasmids	53
3.2.2.11 Sequenzierung	54
3.2.2.12 SDS Gele	54
3.2.2.12.1 Coomassie-Färbung	55
3.2.2.12.2 Western Blot	55
3.2.3 Peptide Nucleic Acids	56
3.2.3.1 PNA Design und Synthese	56
3.2.3.2 PNA-RNA FP Assay	58
3.2.3.3 PNA Pull Down mit isolierter RNA	58
3.2.4 Quantitative massenspektrometrische Analyse des PNA-basierten Pull Downs	59
3.2.4.1 Validierung der SILAC Kandidaten mittels GFP-Pull Down	60
3.2.4.1.1 statistische Analyse des Z-Scores	61
3.2.4.2 Validierung der SILAC Kandidaten mittels Biotin- <i>PANDAR</i> RNA	62
3.2.4.3 Co-Immunopräzipitation mittels GFP-Pull Down	62
3.2.4.4 Überprüfung des <i>BCL-XS</i> Transkripts	63
3.2.5 NF-Y Expression und Aufreinigung	63
3.2.5.1 Expression und Zellaufschluss	63
3.2.5.2 Proteinaufreinigung von GST-NF-YA ₂₃₃₋₃₀₃	64
3.2.5.3 Proteinaufreinigung von 6xHis-NF-YB ₅₁₋₁₄₃ und NF-YC ₂₇₋₁₂₀	64
3.2.5.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	65
3.2.5.5 RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay (REMSA)	65
3.2.6 Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation (PAR-CLIP)	66
3.2.6.1 Herstellung der Zellen	68
3.2.6.2 Immunopräzipitation mit RNase Verdau	68

3.2.6.3 Dephosphorylierung.....	68
3.2.6.4 Radiomarkierung und Phosphorylierung	69
3.2.6.5 SDS-PAGE und Elektroelution.....	69
3.2.6.6 RNA Extraktion	69
3.2.6.7 Ligation des 3'-Adapters.....	70
3.2.6.8 Ligation des 5'-Adapters.....	70
3.2.6.9 Reverse Transkription	71
3.2.6.10 PCR Amplifikation der cDNA	71
4. Ergebnisse	72
4.1 Analyse der endogenen und induzierten PANDAR Expression in humanen Zelllinien	72
4.2 Der trimere Nuklear Transkription Faktor-Y Komplex	77
4.2.1 Expression und Aufreinigung von NF-Y Untereinheiten	77
4.2.2 Komplexbildung von NF-Y mit DNA und <i>PANDAR</i> RNA.....	81
4.2.3 Identifizierung des RNA-Bindemotivs von NF-YA mittels PAR-CLIP	82
4.3 Identifizierung der <i>PANDAR</i> -interagierenden Proteine mittels PNA-SILAC	88
4.3.1 Herstellung und Bindungsaffinität von <i>PANDAR</i> -PNAs.....	88
4.3.2 PNA-SILAC-MS Analyse und Validierung der <i>PANDAR</i> -bindenden Proteine.....	91
4.3.3 <i>PANDAR</i> beeinträchtigt das PTBP1-vermittelte <i>BCL-XS</i> Spleißen.....	99
5. Diskussion	100
5.1 Analyse der endogenen und induzierten <i>PANDAR</i> Expression in humanen Zellen ...	100
5.2 Der trimere NF-Y Komplex	103
5.3 Identifizierung der <i>PANDAR</i> -interagierenden Proteine mittels PNA-SILAC	106
5.3.1 <i>PANDAR</i> beeinträchtigt das PTBP1-vermittelte <i>BCL-XS</i> Spleißen.....	109
6. Zusammenfassung	111
7. Ausblick	113
8. Literatur	114
9. Danksagung	128
10. Anhang	129
11. Lebenslauf	142

Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen der chemischen Verbindungen bzw. Messgrößen und Einheiten wurden gemäß der IUPAC-Nomenklatur bzw. dem internationalen SI-Einheitssystem verwendet.

1/2-sbsRNA1	half-STAU1-binding site RNA
ABC	Ammoniumbiocarbonat
Ac ₂ O	Acetanhydrid
ACN	Acetonitril
AEG	Aminoethylglycin
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BACE1	β-site of APP cleaving enzyme
BACE1-AS	BACE1 antisense RNA
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BCL-XS	B-cell lymphoma-extra small
BCI/NBT	5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat/Nitroblautetrazoliumchlorid
Bhoc	Benzhydryloxycarbonyl
BJ mut	BJ Vorhaut Fibroblasten (H-Ras ^{G12V} SV40TL htert)
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BRCA1	Breast Cancer type 1
CCNB1	G2/mitotic-specific cyclin-B1
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
CDKN1A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (p21 Protein)
CIP	Calf Intestine Phosphatase (Alkalische Phosphatase)
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino carbenium-hexafluorophosphat
DBD	DNA Bindedomäne
DCM	Dichlormethan
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DDSR1	DNA damage-sensitive RNA1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIPEA	Diisopropylethylamin

Verzeichnis

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
Dox	Doxorubicin
DRBD	DNA-RNA-Bindedomäne
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
E2F	E2F Transkriptionsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Enhanced Green fluorescent protein
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EtOH	Ethanol
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FCS	Fetales Kälberserum
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
FP	Fluoreszenz Polarization
FUS	Fused in Sarcoma
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gas5	Growth-Arrest-Specific 5
GSH	Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-Cysteinglycin)
GST	Glutathiontransferase
GW	Gateway
HA-Tag	Human influenza hemagglutinin
HDAC	Histone deacetylase
HFD	Histone fold domain
HMT	Histon-Methyltransferase
hnRNPK	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
hnRNPUL1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein
HOTAIR	HOX transcript antisense RNA
HOTTIP	HOXA transcript at the distal tip
HPLC	Hochflüssigkeitschromatografie
IAA	Iodacetamid

IP	Immunopräzipitation
K _d	Dissoziationskonstante
KH	K-homology
LB	Lysogeny Broth-Medium
lincRNA-p21	long intergenic ncRNA p21 (Synonym: TP53COR1)
lncRNA	long non-coding RNA (lange nicht-kodierende RNA)
LSD1	Lysine-specific demethylase 1A
MA	magnetische Agarose Beads
MAD	mittlere absolute Abweichung (median absolute deviation)
MALAT1	Metastasis-associated lung adenocarcinoma 1
miRNA	micro RNA
MLL	Mixed Lineage Leukemia
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
ncRNA	non-coding RNA (nicht-kodierende RNA)
NEAT1	Nuclear Enriched Abundant Transcript 1
NF-Y	Nuklear Transkription Faktor Y
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	N-Methyl-2-Pyrrolidon
NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein
NSCLC	non-small cell lung cancer
NTP	Ribonukleosid-5'-Triphosphat
ODT	Octadecanthiol
Oxyma	Ethyl-2-Cyano-2-(Hydroxyimino)acetat
p16 ^{INK4A}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Gen: <i>CDKN2A</i>)
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (Gen: <i>CDKN1A</i>)
p53	Tumorsuppressor p53
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PANDAR	Promoter of CDKN1A Antisense DNA Damage Activated RNA
PAR-CLIP	Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation
PBS	Phosphate-buffered saline

PEG	Polyethylenglycol
piRNA	PIWI-RNA
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNA	Peptide Nucleic Acids
PNK	Polynukleotid-5'-hydroxylkinase
Pnky	Pinky
PRC	Polycomb Repressive Complex
PSPC1	Paraspeckle component 1
PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTENP	Phosphatase and tensin homolog pseudogene 1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PyBop	(Benzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
qPCR	quantitative Real Time PCR
Rb	Retinoblastoma Protein
RBD	RNA-Bindedomäne
RBM14	RNA-binding protein 14
RBMS2	RNA-binding motif, single-stranded-interacting Protein
RBP	RNA-bindendes Protein
REMSA	RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay
RFC1	Replication Factor C subunit A
RGG-Box	Arginin-Glycin-Glycin-Box
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RRM	RNA Recognition Motif
Rq	relative Quantität
SAD	Subunit Association Domain
SAFA	Scaffold Attachment Factor A (Synonym: hnRNPU)
SAM68	Src-associated in mitosis 68 kDa protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie (Size-exclusion chromatographie)
SFPQ	Spleißfaktor, Prolin/Glutamin-reich
SHARP	SMART/HDAC1-associated repressor protein
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture

SINEB2	Short Interspersed Nuclear Element B2
siRNA	small interfering RNA
SMART	silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
snoRNA	small nucleolar RNA
SNP	Single Nucleotid Polymorphismen
snRNA	small nuclear RNA
SOC	Super Optimal Broth-Medium
SRSF1	Serin/Arginin-reicher Spleißfaktor 1
ss	single-stranded
STAU1	Staufen1
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	Terrific Broth-Medium
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TBS/TBS-T	Tris-buffered saline/-Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilane
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
TRIS	Trishydroxymethylaminoethan
tRNA	transfer RNA
U2AF35	Spleißfaktor U2AF 35kDa Untereinheit (Gen: <i>U2AF1</i>)
U2AF65	Spleißfaktor U2AF 65kDa Untereinheit (Gen: <i>U2AF2</i>)
Uchl1	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L
Uchl1AS	Uchl1 antisense RNA
UTR	untranslatierte Region
WDR5	WD repeat containing protein 5
Xist	X-inactive specific transcript

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nicht-kodierende RNA im humanen Genom.....	14
Abbildung 2: Lage der nicht-kodierenden zu Protein-kodierenden Genen.....	15
Abbildung 3: Mechanismen der lncRNA Funktionen.....	18
Abbildung 4: Funktionelle Kategorien von lncRNAs in der Genregulation.....	20
Abbildung 5: Struktur von RNA-Protein Interaktionen	22
Abbildung 6: Effekt von lncRNA <i>PANDAR</i> bei DNA Schaden	25
Abbildung 7: Modell der SAFA- <i>PANDAR</i> -PRC-vermittelten Koordination von Seneszenz und Proliferation.....	27
Abbildung 8: Aufbau des NF-Y trimeren Komplexes	29
Abbildung 9: Schematischer Arbeitsablauf der PNA Synthese	57
Abbildung 10: Schematischer Arbeitsablauf PAR-CLIP.....	67
Abbildung 11: Doxorubicin-Titration humaner Zelllinien.....	73
Abbildung 12: Endogene und Doxorubicin-induzierte <i>PANDAR</i> Expression in humanen Zelllinien	75
Abbildung 13: Analyse der <i>PANDAR</i> -abhängigen Zellviabilität.....	76
Abbildung 14: Aufreinigung von NF-YA ₂₃₃₋₃₀₃	78
Abbildung 15: Aufreinigung von co-exprimiertem 6xHis-NF-YB ₅₁₋₁₄₃ und NF-YC ₂₇₋₁₂₀	80
Abbildung 16: Formierung des NF-Y-DNA Komplexes.....	81
Abbildung 17: Interaktion der <i>PANDAR</i> RNA mit aufgereinigtem NF-Y Protein.....	82
Abbildung 18: Präoperative Gele des Flag-NF-YA PAR-CLIPs Nr.2	84
Abbildung 19: Verteilung der analysierten Daten-Clusterlänge der NGS Ergebnisse	85
Abbildung 20: NF-YA Bindemotive.....	86
Abbildung 21: Interaktionsstudie des NF-YA wildtypischen und mutierten Bindemotivs an <i>PANDAR</i> RNA	88
Abbildung 22: Vorhersage der <i>PANDAR</i> Sekundärstruktur mittels mfold.....	89
Abbildung 23: HPLC-MS-Analyse der aufgereinigten Biotin-PEG5-PNA1	90
Abbildung 24: Affinität von gegen <i>PANDAR</i> gerichteten PNAs an <i>PANDAR</i> lncRNA	91
Abbildung 25: Experimenteller Workflow des PNA-SILAC-MS Experiments.....	92
Abbildung 26: SILAC Ergebnisse des PNA- <i>PANDAR</i> RNA-basierten Pull Downs.....	93
Abbildung 27: Analyse von gebundener <i>PANDAR</i> RNA an SILAC Proteinkandidaten.....	95
Abbildung 28: Western Blot Analyse der gebundenen Proteine an Biotin- <i>PANDAR</i> RNA....	96
Abbildung 29: Western Blot Analyse der RNA-abhängigen Interaktion von SAFA, hnRNPUL1, PTBP1 und U2AF65	98

Abbildung 30: <i>PANDAR</i> RNA reguliert <i>BCL-XS</i>	99
Abbildung 31: Modell der <i>PANDAR</i> -abhängigen Regulation des <i>BCL-XS</i> alternativen Spleißens	112
Abbildung 32: Western Blot Analyse der GFP-Kontrolle	129
Abbildung 33: Stabile Flag-NF-YA U2OS Zelllinie	129
Abbildung 34: p53 Stabilisierung durch Doxorubicin-Behandlung	129
Abbildung 35: Transfektion und Western Blot Analyse der eGFP-Fusionsproteine.....	130
Abbildung 36: PNA Bausteine	131
Abbildung 37: Aufreinigung der Biotin-PNAs	132
Abbildung 38: Aufreinigung der FITC-PNAs	133
Abbildung 39: Plasmidkarten.....	134
Abbildung 40: DNA- und Proteinmarker.....	141

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: LncRNA-assoziierte humane Erkrankungen.....	24
Tabelle 2: verwendete Geräte.....	32
Tabelle 3: verwendete Software	33
Tabelle 4: verwendete Einwegartikel	33
Tabelle 5: verwendete Chemikalien und Reagenzien	33
Tabelle 6: verwendete Medien und Lösungen	34
Tabelle 7: verwendete Enzyme und Enzymlösungen	34
Tabelle 8: Real Time PCR Primer.....	35
Tabelle 9: Antikörper	35
Tabelle 10: humane Zelllinien.....	35
Tabelle 11: Liste der verwendeten Bakterienstämme	36
Tabelle 12: Liste der verwendeten Plasmide.....	36
Tabelle 13: Liste der verwendeten DsiRNAs.....	37
Tabelle 14: Liste der verwendeten Kits.....	38
Tabelle 15: Puffer für RNA.....	38
Tabelle 16: Puffer für Pull-Down Experimente	38
Tabelle 17: Puffer für SDS-PAGE und Western Blot.....	39
Tabelle 18: Puffer für Agarosegele	39
Tabelle 19: Puffer für NF-YA Aufreinigung	40
Tabelle 20: Puffer für NF-YB/NF-YC Aufreinigung	40

Tabelle 21: Puffer für EMSA und REMSA	41
Tabelle 22: Puffer für PAR-CLIP	41
Tabelle 23: SDS-Gel Zusammensetzung	42
Tabelle 24: Tricin-Gel Zusammensetzung	42
Tabelle 25: Natives Polyacrylamidgel Zusammensetzung	42
Tabelle 26: Reaktionsansatz qPCR	46
Tabelle 27: Programm der qPCR	46
Tabelle 28: Reaktionsansatz <i>in vitro</i> Transkription	48
Tabelle 29: Reaktionsansatz <i>in vitro</i> Transkription (Biotin-RNA)	49
Tabelle 30: Reaktionsansatz PCR	49
Tabelle 31: Programm PCR	50
Tabelle 32: Reaktionsansatz Kolonie-PCR	50
Tabelle 33: Programm Kolonie-PCR	51
Tabelle 34: Reaktionsansatz Sequenzierung	54
Tabelle 35: Programm der Sequenzierung	54
Tabelle 36: hergestellte gegen <i>PANDAR</i> RNA gerichtete PNAs	58
Tabelle 37: Kombination der SILAC-Proben	59
Tabelle 38: Verwendete NF-Y Konstrukte	63
Tabelle 39: Programm zur Amplifikation der cDNA	71
Tabelle 40: Mutanten des NF-YA Bindemotivs	87
Tabelle 41: Datenbanknummern der klonierten Konstrukte	135
Tabelle 42: Liste der verwendeten Klonierungsprimer	136
Tabelle 43: Liste der verwendeten Sequenzierprimer	140

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Zellzahl (Neubauer Zählkammer)	44
Formel 2: Berechnung des Δ CT-Wertes	47
Formel 3: Berechnung des $\Delta\Delta$ CT-Wertes	47
Formel 4: Berechnung der kombinierten Standardfehler	47
Formel 5: Berechnung des biologischen Triplikats $\Delta\Delta$ CT	47
Formel 6: Berechnung der relativen Quantität (Rq)	47
Formel 7: Berechnung des beidseitigen Konfidenzintervalls	47
Formel 8: Berechnung der relativen Konfidenzintervalle	48
Formel 9: Berechnung des p-Wertes (einseitig)	48

Formel 10: Berechnung des p-Wertes (zweiseitig)	48
Formel 11: Berechnung des Medians	61
Formel 12: Berechnung der mittleren absoluten Abweichung (MAD).....	61
Formel 13: Berechnung des Z-Scores	61

1. Einleitung

Die Entdeckung der helikalen Struktur der DNA, durch Francis Crick und James Watson, im Jahre 1953 war gefolgt von der Entschlüsselung des genetischen Codes (Watson and Crick, 1953). Im Jahre 1958 publizierte Francis Crick das zentrale Dogma der molekularen Biologie und beschrieb darin den Informationsfluss von DNA zu RNA hinzu Protein (Crick, 1958).

Die Annahme, dass sich die Komplexität von höheren Organismen in einer steigenden Anzahl an Protein-kodierenden Genen widerspiegelt konnte nicht gezeigt werden und wurde als G-Wert Paradoxon beschrieben (Hahn and Wray, 2002). Beispielsweise konnte im Rahmen des humanen Genom Projekts gezeigt werden, dass die Anzahl der Protein-kodierenden Gene im humanen Genom mit 20000-25000 bei etwa 2% liegt (Lander and Al, 2001; Venter et al., 2001). Im Vergleich dazu besitzt der Nematodenwurm *Caenorhabditis elegans*, welcher nur aus 1000 Zellen besteht, ~19700 annotierte Protein-kodierende Gene (~20% des Genoms), (Hillier et al., 2005). Ein Teil dieses Paradoxons kann damit erklärt werden, dass in höheren Organismen die Transkripte dem alternativen Spleißen unterzogen werden, wodurch sich eine größere Anzahl an Protein-Isoformen ergibt (Nagasaki et al., 2005). Darüber hinaus nimmt die Anzahl an nicht Protein-kodierenden Genen im Verhältnis zur Gesamtmenge der genomischen DNA in höheren Organismen zu (Taft et al., 2007). Die Entwicklung neuer hochsensitiver und high throughput Sequenziertechniken ermöglichten einen detaillierten Überblick über das Ausmaß des eukaryotischen Transkriptoms (Nagalakshmi et al., 2008). Analysen ergaben, dass ein Großteil dieser nicht-kodierenden Gene in Eukaryoten aktiv transkribiert, jedoch nicht in Proteine translatiert werden (Kapranov et al., 2007). In Bezug auf das humane Genom konnte gezeigt werden, dass bis zu 80% des Genoms aktiv sind (Consortium et al., 2012) und bis zu 75% aktiv transkribiert werden (Djebali et al., 2012) (Abbildung 1).

1.1 Non-coding RNA

Bei einem Großteil des Transkriptoms handelt es sich um die viele Jahrzehnte als nicht-funktionell deklarierten nicht Protein-kodierenden RNAs (non-coding RNAs, ncRNAs), welche in den letzten Jahrzehnten in den Fokus aktueller Forschung rückten (Huang and Zhang, 2014). Bei ncRNAs handelt es sich im Allgemeinen um RNAs, welche nicht in Proteine translatiert werden (Abbildung 1). Hierbei kann eine Einteilung in die konstitutiv exprimierten organisatorischen ncRNAs (ribosomal, transfer, small nuclear und small nucleolar) und regulatorischen ncRNAs vorgenommen werden. Die regulatorischen ncRNAs

werden anhand ihrer Größe in zwei Kategorien eingeteilt, small ncRNAs (<200 nt) und long ncRNAs (>200 nt). Small ncRNAs, wie microRNAs (miRNA) und small interfering RNAs (siRNA), sind unter anderem am posttranskriptionalem Gen-Silencing beteiligt. Im Gegensatz dazu, handelt es sich bei long ncRNAs (lncRNAs) um eine Gruppe funktionell verschiedener Transkriptklassen. Sie sind an vielen verschiedenen biologischen Prozessen, wie den Chromatinmodifikationen, dem Spleißen und der Formierung funktioneller subnukleärer Strukturen beteiligt (Neguembor et al., 2014).

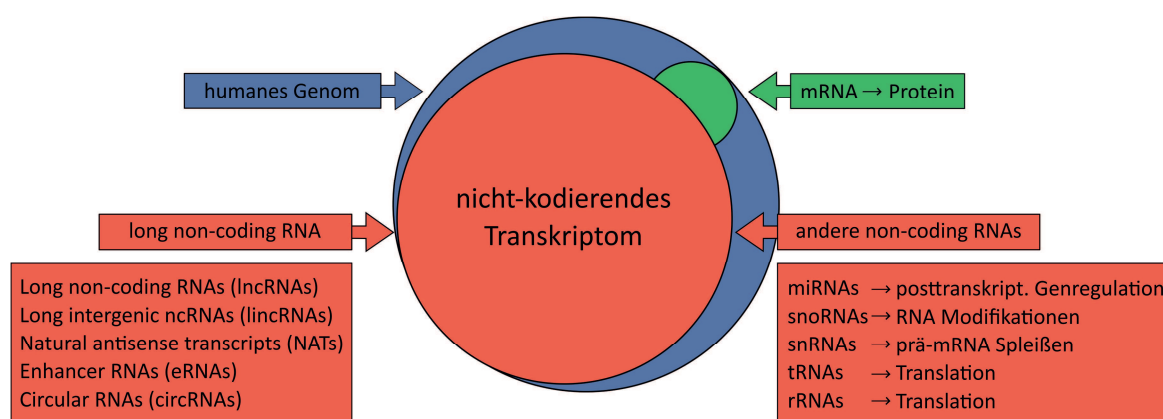


Abbildung 1: Nicht-kodierende RNA im humanen Genom

Das humane Genom (blau) wird bis zu 75% aktiv transkribiert, wobei nur 2% des Genoms Proteinkodierend (grün) sind. Der Großteil des Transkriptoms besteht aus nicht-kodierenden RNAs (rot). mRNA: messenger RNA, miRNA: microRNA, piRNA: piwi-interacting RNA, snoRNA: small nucleolar RNA, snRNA: small nuclear RNA, tRNA: transfer RNA, rRNA: ribosomale RNA. Modifiziert nach (Boon et al., 2016).

Long non-coding RNAs kommen in verschiedenen Tierarten, als auch in Pflanzen, Hefen, Prokaryonten und Viren vor (Bernstein et al., 1993; Reeves et al., 2007; Houseley et al., 2008; Swiezewski et al., 2009; Guttman et al., 2009; Angrand et al., 2015). Jedoch liegt die Primärstruktur meist nicht konserviert vor, sondern variiert zwischen den Spezies (Johnsson et al., 2014; Wood et al., 2013; Ponting et al., 2009). Bis heute konnten durch neue Techniken, wie Deep Sequencing Methoden, 111685 humane lncRNA Transkripte beschrieben werden (LNCipedia.org Version 3.1).

Long ncRNAs ähneln mRNAs, da sie häufig 5'-capped, 3'-polyadenyliert, gespleißt und von der RNA Polymerase II transkribiert werden. Liegt keine Polyadenylierung vor, so kann dies auf eine Transkription durch die RNA Polymerase III, das Spleißen einer zuvor polyadenylierten lncRNA oder auch auf andere RNA Prozessierungen zurückzuführen sein (Dieci et al., 2007; Kapranov et al., 2007; Wilusz, 2016). Im Gegensatz zu mRNAs besitzen lncRNAs meist keinen oder nur einen kleinen Open Reading Frame (Dinger et al., 2008; Bánfai et al., 2012; Niazi and Valadkhan, 2012).

Bei der genomischen Lokalisation von nicht-kodierenden und Protein-kodierenden Genen handelt es sich um ein komplexes, modulares Modell. Basierend auf der genomischen Nähe zu Protein-kodierenden Genen, wird die Transkription der nicht-kodierenden Gene in Bezug auf benachbarte Protein-kodierende Gene in fünf Kategorien eingeteilt: sense, antisense, bidirectional, intronic und intergenic (Abbildung 2). Bei der ncRNA Expression in sense bzw. antisense Richtung handelt es sich um eine Überlappung in mindestens einem Exon auf demselben bzw. gegenüberliegenden Strang. Werden nicht-kodierende und benachbarte kodierende Gene auf gegenüberliegenden Strängen, jedoch in räumlicher genomischer Nähe zueinander, transkribiert, handelt es sich um die bidirectional Transkription. Stammt die lncRNA von einem Intron eines anderen Transkriptes handelt es sich um intronic. Liegt die lncRNA hingegen nicht in der Nähe von Protein-kodierenden Genen wird die Lokalisation als intergenic beschrieben (Ponting et al., 2009; Mercer et al., 2009).

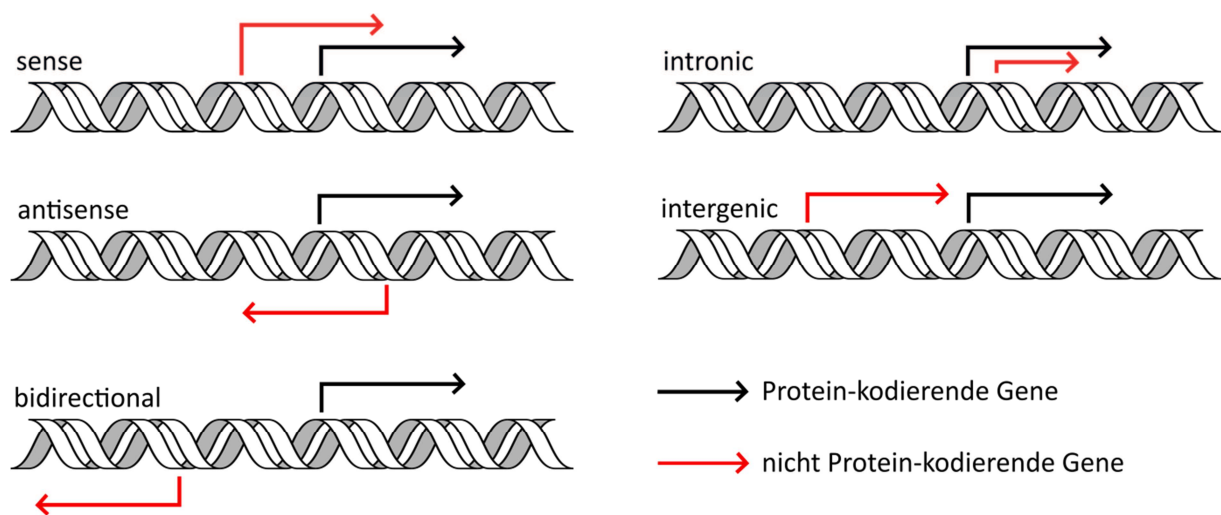


Abbildung 2: Lage der nicht-kodierenden zu Protein-kodierenden Genen

sense: nicht-kodierendes Gen überlappt mit Protein-kodierendem Gen in gleicher Richtung; antisense: nicht-kodierendes Gen überlappt mit Protein-kodierendem Gen in gegenüberliegender Richtung; bidirectional: nicht-kodierendes Gen liegt in gegenüberliegender Richtung zu Protein-kodierendem Gen; intronic: nicht-kodierendes Gen liegt in einem Intron; intergenic: nicht-kodierendes Gen liegt nicht in der Nähe eines Protein-kodierenden Gens.

1.2 Funktionen der lncRNAs

Die Expression von lncRNAs ist dynamisch in unterschiedlichen Geweben und in Zellen des gleichen Gewebes reguliert, was auf eine zielgerichtete Regulation hindeutet (Cabili et al., 2011; Ward et al., 2015). Mit der Gewebs- und Zellspezifität einhergehend sind physiologische und pathologische Zelltyp-spezifische Funktionen, welche maßgeblich für die

Entwicklung, Homöostasis und Krankheitsentstehung sind (Huarte and Rinn, 2010; Hu et al., 2012; Wapinski and Chang, 2011; Zhu et al., 2013).

Die Lokalisation von lncRNAs ist nicht auf ein zelluläres Kompartiment beschränkt, sondern kann je nach Funktion variieren (Djebali et al., 2012; van Heesch et al., 2014; Lennox and Behlke, 2015) (Abbildung 3). Im Zellkern rekrutieren die lncRNAs Chromatin-modifizierende Enzyme und Transkriptionsfaktoren, regulieren das Spleißen, die Bildung von Chromatin-Loops und funktioneller subnukleärer Strukturen (Neguembor et al., 2014). Durch die Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Enzymen kommt es durch das Setzen von Histonmarkierungen zur Aktivierung und Inhibierung von Genen (Abbildung 3A). Darüber hinaus kann die Transkription, durch die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren zum Ort der Genexpression, reguliert werden (Abbildung 3B). Die zugrunde liegenden Mechanismen und zugehörigen Beispiele werden in Kapitel 1.3 näher beschrieben.

Eine weitere Funktion der lncRNAs besteht in der Modulation des Spleißvorgangs, durch die Interaktion mit mRNAs oder am Spleißen beteiligter Proteine (Abbildung 3C). Ein Beispiel für eine im Spleißen involvierte lncRNA ist Pinky (*Pnky*). Die Interaktion von *Pnky* mit dem am Spleißen beteiligten Protein Polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1) reguliert die Expression und das Spleißen von Transkripten die wichtig für die neurale Differenzierung sind (Ramos et al., 2015).

Die Bildung von höheren nukleären Substrukturen ist eine weitere Funktion von lncRNAs (Abbildung 3D-E). Beispielsweise können lncRNAs Chromatin-Loops und somit auch die Transkription regulieren (Abbildung 3D). Ein Vertreter dieser funktionellen Klasse ist die lncRNA HOXA transcript at the distal tip (*HOTTIP*), die über chromosomales Looping mit dem Mixed Lineage Leukemia- WD repeat containing protein 5 (MLL-WDR5) Komplex interagiert, wodurch die Histon3 Lysin4 Trimethylierung (H3K4me3) und Genaktivierung eingeleitet wird (Wang et al., 2011). Die Bildung funktioneller subnukleärer Strukturen, wie den Paraspeckles, wird durch die lncRNA Nuclear Enriched Abundant Transcript 1 (*NEAT1*) getriggert (Abbildung 3E). Hierbei rekrutiert *NEAT1* verschiedene Proteine, wie Paraspeckle component 1 (PSPC1), RNA-binding protein 14 (RBM14), Spleißfaktor Prolin/Glutamin-reich (SFPQ) und Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NONO) was für den koordinierten Aufbau der Paraspeckles sorgt. Darüber hinaus sind diese Proteine unter anderem bekannt für die Regulation der Transkription, der nukleären Retention von RNAs und dem alternativem Spleißen von prä-mRNA (Clemson et al., 2009).

Hingegen können lncRNAs im Zytoplasma die Translation und Degradation von mRNA modulieren. Die Kontrolle der Translation kann unter anderem durch die Bindung der

lncRNA an mRNA erfolgen, wodurch die mRNA-Beladung mit Ribosomen reguliert wird (Abbildung 3F). Ein Beispiel hierfür ist die antisense lncRNA *Uchl1AS*, die eine 73 nt lange komplementäre Sequenz zu der Protein-kodierenden mRNA Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (*Uchl1*) und ein invertiertes Short Interspersed Nuclear Element B2 (*SINEB2*) Repeat Element aufweist. Nach der sequenzspezifischen Bindung der lncRNA an die mRNA, sorgt die *SINEB2* Effektor-Domäne für die Assoziation von *Uchl1* mRNA mit aktiven Polysomen, was zu einer erhöhten Translation führt (Carrieri et al., 2012).

Hinsichtlich des Degradationsprozesses können lncRNAs die mRNA vor dem Abbau schützen oder auch das Rekrutieren der Degradationsmaschinerie vermitteln (Abbildung 3G). Eine lncRNA die den mRNA-Degradationsprozess vermittelt ist die half-STAU1-binding site RNA (*l/2-sbsRNA1*). Diese lncRNA bindet an 3'-untranslatierte Regionen (UTRs) in einem Prozess der als Staufen1 (STAU1)-vermittelter mRNA Abbau bekannt ist. Dieser Prozess beinhaltet die unperfekte Basenpaarung von lncRNA-Alu Elementen an mRNA-Alu Elemente, wobei diese Interaktion durch das doppelsträngige RNA-bindende Protein STAU1 erkannt wird und der mRNA Abbau eingeleitet wird (Gong and Maquat, 2011).

Eine weitere Funktion ist die lncRNA-vermittelte Sequestration von miRNA, wodurch die miRNA von der mRNA-Bindung abgehalten wird und somit die Expression begünstigt wird (Abbildung 3H). Ein Beispiel für diese Funktionsweise ist die lncRNA *PTENP1*, ein Pseudogen des Tumorsuppressor Phosphatase and tensin homolog (*PTEN*). Beide weisen eine starke Homologie in der 3'-UTR auf und werden durch ein ähnliches miRNA-Set reguliert. Dadurch kann *PTENP1* die *PTEN*-inhibitorischen miRNAs abfangen, deren Aktivität limitieren und somit die Expression von PTEN verstärken (Poliseno et al., 2010).

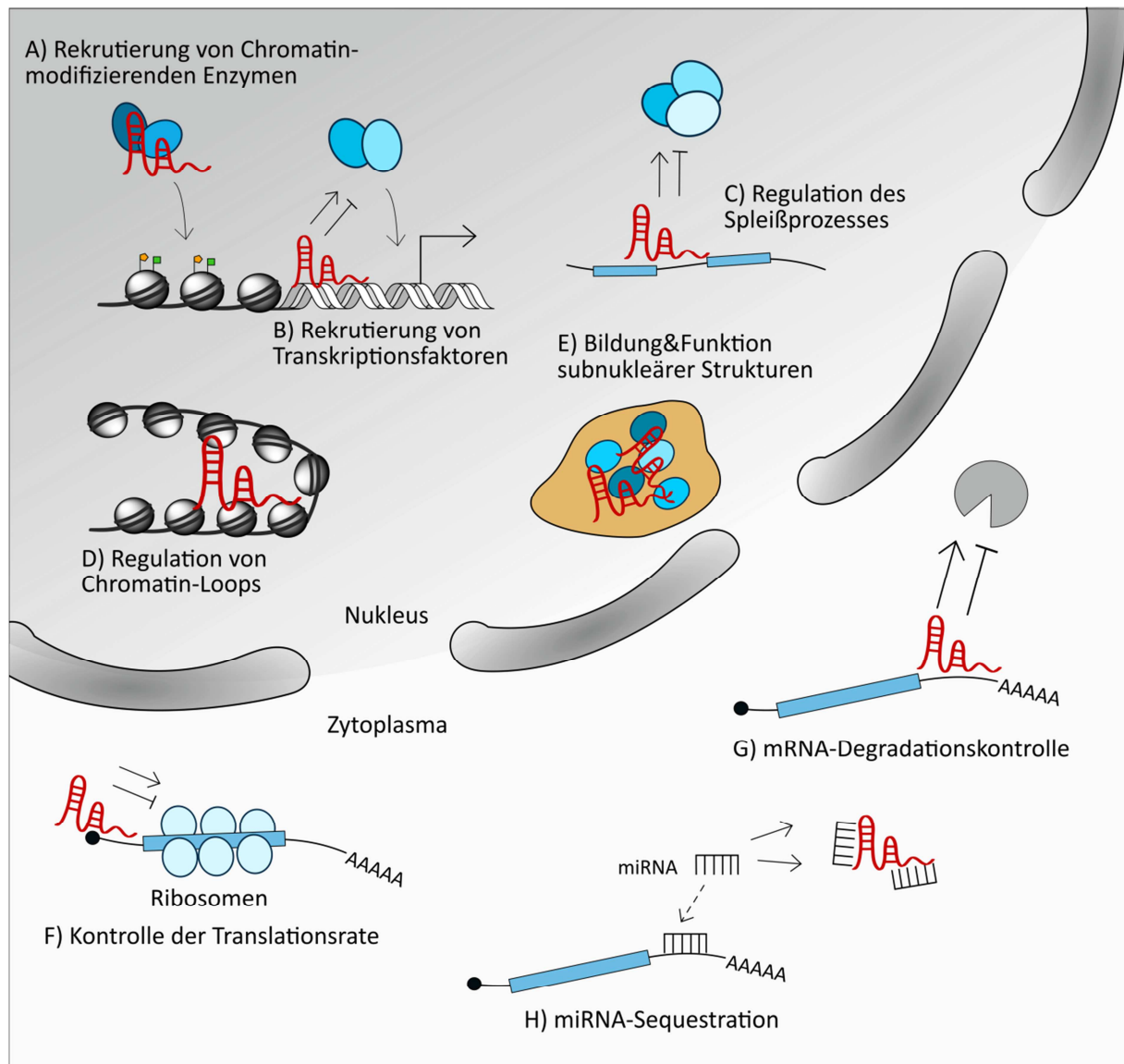


Abbildung 3: Mechanismen der lncRNA Funktionen

(A) LncRNAs rekrutieren Chromatin-modifizierende Enzyme für aktivierende oder reprimierende Histonmarkierungen. (B) Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren durch lncRNAs führt zur Regulation der Transkriptionsmaschinerie. (C) LncRNAs können durch die Interaktion mit mRNAs oder Proteinen den Spleißprozess modulieren. (D-E) LncRNAs können zur Bildung höherer subnukleärer Strukturen, wie Chromatin-Loops und Zellkernkörpern, beitragen. (F) LncRNAs können die Translationsrate durch Modulation der Polysom-Ladung von mRNAs kontrollieren. (G) Die mRNA-Degradation kann durch lncRNAs moduliert werden. (H) LncRNAs können als miRNA Schwamm fungieren, wodurch die Expression der mRNA durch sequestrierte miRNA ermöglicht wird. Modifiziert nach (Neguembor et al., 2014).

1.3 lncRNA: Mechanismen der Genregulation

Die Funktionsweisen der lncRNAs zur Regulation zellulärer Prozesse sind vielfältig und können auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Diese funktionelle Diversität zeigt sich unter anderem in der Genregulation. Im Rahmen dieser können verschiedene Mechanismen (Signal,

Decoy, Guide und Scaffold) beobachtet werden, wobei die lncRNAs nicht nur auf einen Mechanismus beschränkt sein müssen (Abbildung 4).

Die Signal-lncRNAs können im Allgemeinen als molekulare Signale (Abbildung 4A) gesehen werden, da ihre Transkription in einem zeitlich und räumlich spezifischen Muster abläuft, um beispielsweise auf verschiedenste Stimuli zu reagieren (Wang and Chang, 2011). Ein Beispiel für eine Signal-lncRNA ist die durch DNA Schaden-induzierte long intergenic ncRNA *lincRNA-p21*, welche upstream des Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (*CDKN1A* (p21 Protein)) Gens lokalisiert ist. Diese durch p53-induzierte *lincRNA-p21* spielt eine wichtige regulatorische Rolle als Transkriptionsrepressor im kanonischen p53 Signalweg. Die Interaktion von *lincRNA-p21* mit dem heterogeneous ribonucleoprotein K (hnRNPK) führt zur transkriptionalen Repression p53-regulierter Gene und reguliert die Apoptose (Huarte et al., 2010).

Die Decoy-lncRNAs (Abbildung 4B) können mit regulatorischen RNAs wie miRNAs und Proteinen wie DNA-bindenden Proteinen und Histon-modifizierenden Enzymen interagieren, wodurch die Bindung dieser an mRNA oder Chromatinregionen verhindert werden (Hamilton et al., 2015). Ein Beispiel für eine Decoy-lncRNA ist die lncRNA Promoter of *CDKN1A* DNA Damage Activated RNA (*PANDAR*). *PANDAR* interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Nuclear Factor Y Subunit A (NF-YA), wodurch dieser von Promotorregionen von pro-apoptotischen Genen abgezogen und die Transkription dieser Gene verhindert wird (Hung et al., 2011).

Im Falle von Guide-RNAs (Abbildung 4C) können die lncRNAs spezifische Proteine binden, um diese zum Ort der Genregulation zu rekrutieren. So kann unter anderem die Genexpression sowohl in cis (nahe der lncRNA Transkription), als auch in trans (entfernt von der lncRNA Transkription) reguliert werden (Wang and Chang, 2011). Ein Vertreter dieser Guide-lncRNAs ist die in der X-Chromosominaktivierung involvierte lncRNA X-inactive specific transcript (*Xist*). Die Interaktion von *Xist* mit dem SMART/HDAC1-associated repressor protein (SHARP) - silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) Komplex sorgt für die Rekrutierung zum X-Chromosom, Aktivierung der Histon Deacetylase 3 (HDAC3) mit nachfolgender Histon-Deacetylierung und führt somit zum Ausschluss der RNA Polymerase vom inaktivierten X-Chromosom (McHugh et al., 2015).

Bei Scaffold-RNAs (Abbildung 4D) stellen die lncRNAs eine Art Plattform für die Interaktion mit verschiedenen Proteinen dar, wodurch diese in räumliche Nähe gebracht werden. Hierbei können sowohl stabile strukturelle RNA-Proteinkomplexe geformt, als auch die Genexpression beeinflusst werden (Wang and Chang, 2011). Beispielsweise vereint die

lncRNA HOX transcript antisense RNA (*HOTAIR*), mit ihrer modulären Architektur, den Polycomb-Repressiven-Komplex 2 (PRC2) und die Lysin-spezifische Demethylase 1A (LSD1) in einen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex. Während das 5'-Ende von *HOTAIR* mit einer Untereinheit des PRC2 Komplexes interagiert, bindet das 3'-Ende an LSD1, was die Demethylierung von H3K4 katalysiert und somit zur Genrepression führt (Tsai et al., 2010).

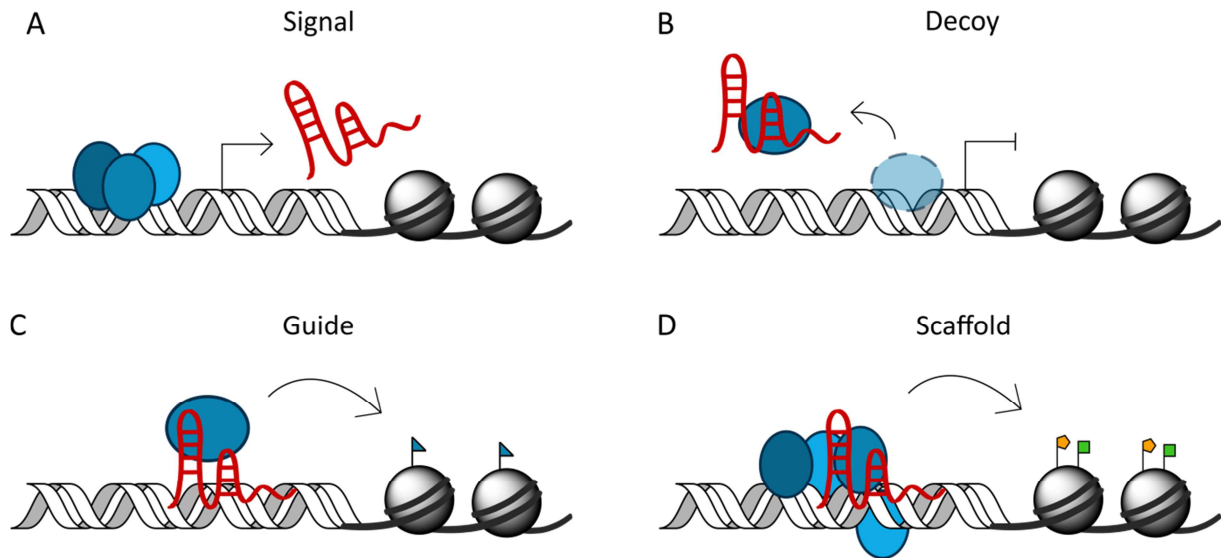


Abbildung 4: Funktionelle Kategorien von lncRNAs in der Genregulation

(A) Signal: lncRNAs können als molekulare Signale durch ihre eigene Transkription die zeitliche und räumliche Genregulation anzeigen. (B) Decoy: lncRNAs können Proteine, wie Transkriptionsfaktoren, durch Bindung von der DNA sequestrieren. (C) Guide: lncRNAs können Chromatin-modifizierende Enzyme rekrutieren, um Zielgene in cis (nahe der lncRNA Expression) oder trans (entfernte Gene) zu beeinflussen. (D) Scaffold: lncRNAs können durch die gleichzeitige Bindung mehrerer Proteine, diese in räumliche Nähe zueinander bringen, Histonmodifikationen beeinflussen oder auch stabile strukturelle RNA-Proteinkomplexe formen. Modifiziert nach (Wang and Chang, 2011).

1.4 Bindedomänen der RNA-Protein Interaktionen

Eine Vielzahl von zellulären Prozessen wird durch interagierende lncRNAs mit RNA-bindenden Proteinen (RBP) reguliert, wobei die genauen molekularen Mechanismen der meisten Protein-lncRNA Interaktionen noch nicht geklärt sind (Wang and Chang, 2011; Guttman and Rinn, 2012; Blythe et al., 2016).

Für eine spezifische Erkennung und Bindung verschiedener RNA Typen besitzen die RBPs hochkonservierte RNA-bindende Domänen (RBDs). Die Diversität der verschiedenen RBDs ermöglicht die RNA Bindung von einzelsträngiger, doppelsträngiger und sequenzspezifischer RNA und komplexen RNA Strukturen, wie Stem Loops, Basepair mismatches und Bulges (Jones, 2001; Lunde et al., 2007; Mackay et al., 2011). Die am häufigsten vorkommenden Domänen sind unter anderem das RNA Recognition Motif (RRM), die doppelsträngige RNA

bindende Domäne (dsRBD), die Zink-Finger Domäne und die K-homology (KH) Domäne (Ascano et al., 2011). Das RRM (Abbildung 5A) besteht aus 80-90 Aminosäuren, bildet ein vier-strängiges β -Faltblatt aus und bindet über drei Aminosäuren an einzelsträngige RNA. Hierbei interagiert ein Arginin oder Lysin über Salzbrücken mit dem RNA-Phosphodiester Rückgrat, während zwei aromatische Aminosäuren sequenzspezifisch mit den RNA-Nukleobasen interagieren. Die Erkennung der Nukleobasen umfasst je nach RRM bis zu 8 Nukleotide (Lunde et al., 2007).

Die dsRBDs (Abbildung 5B) bestehen aus 70-90 Aminosäuren, bilden $\alpha\beta$ -Domänen aus und interagieren mit doppelsträngiger RNA (dsRNA), wobei diese keine spezifischen Kontakte mit den Nukleobasen eingehen. Die Bindung erfolgt über zwei kleine Bindegruben und eine große Bindegrube an der Oberfläche der dsRNA. Die intermolekularen Kontakte werden über das 2'OH und Phosphat-Rückgrat vermittelt. Die Spezifität kann hierbei durch mehrere dsRBDs erfolgen oder auch durch die N-terminale Helix welche mit Stem Loops, Basepair mismatches oder Bulges interagiert (Lunde et al., 2007).

Die KH (K Homology) Domäne (Abbildung 5C) bindet sowohl einzelsträngige (ss) DNA als auch ssRNA und besteht aus ca. 70 Aminosäuren, die ein drei-strängiges β -Faltblatt und drei α -Helices ausbilden. Darüber hinaus befindet sich eine wichtige, nahe dem Zentrum gelegene, Sequenzsignatur (I/L/V)IGXXGXX(I/L/V). Die Bindung von vier Nukleotiden erfolgt über die durch GXXG, β -Faltblatt und α -Helices geformte Grube. Im Gegensatz zu dem RRM erfolgt die Erkennung nicht durch aromatische Aminosäuren, sondern durch Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Interaktionen und komplementärer Oberflächenform von Protein und RNA (Lunde et al., 2007).

Die sowohl RNA als auch DNA bindenden Zink-Finger (Abbildung 5D) formen Wasserstoffbrückenbindungen in der Erkennungs- α -Helix aus und interagieren über Watson-Crick Basenpaarung mit der großen Grube der DNA (Lunde et al., 2007).

Ein Großteil (65%) der RNA-bindenden Proteine besitzt nur eine RBD, wobei ein kleinerer Anteil (35%) weitere RBDs, zusätzliche Wiederholungen der gleichen RBD oder auch RNA prozessierende Domänen besitzen (Ascano et al., 2011). Viele lncRNA-bindende Proteine weisen eine kombinatorische und strukturelle Anordnung mehrere RBD Wiederholungen auf, wodurch die Bindeaffinität und Spezifität verstärkt wird. Außerdem können durch diese Wiederholungen längere RNA-Bereiche oder auch verschiedene RNA Moleküle gleichzeitig gebunden werden (Lunde et al., 2007; Änkö and Neugebauer, 2012). Ein Beispiel ist hnRNPK, welches drei KH-Domänen und eine RGG (Arginin-Glycin-Glycin) Box besitzt, wodurch es mit der *lincRNA-p21* und *NEAT1* interagiert (Huarte et al., 2010; Naganuma et al.,

2012). Hingegen weisen die Polycomb-Repressiven-Komplexe keine charakterisierten RBDs auf und sind bekannt für die Interaktion mit mehreren lncRNAs (Zhao et al., 2010). Dies deutet daraufhin, dass sie mit der lncRNA über das Phosphat-Rückgrat interagieren oder auch über besondere Mechanismen, wie die Interaktion der lncRNA Growth-Arrest-Specific 5 (*Gas5*) mit der DNA-bindenden Domäne des Steroid Rezeptors (Hudson et al., 2014; Blythe et al., 2016).

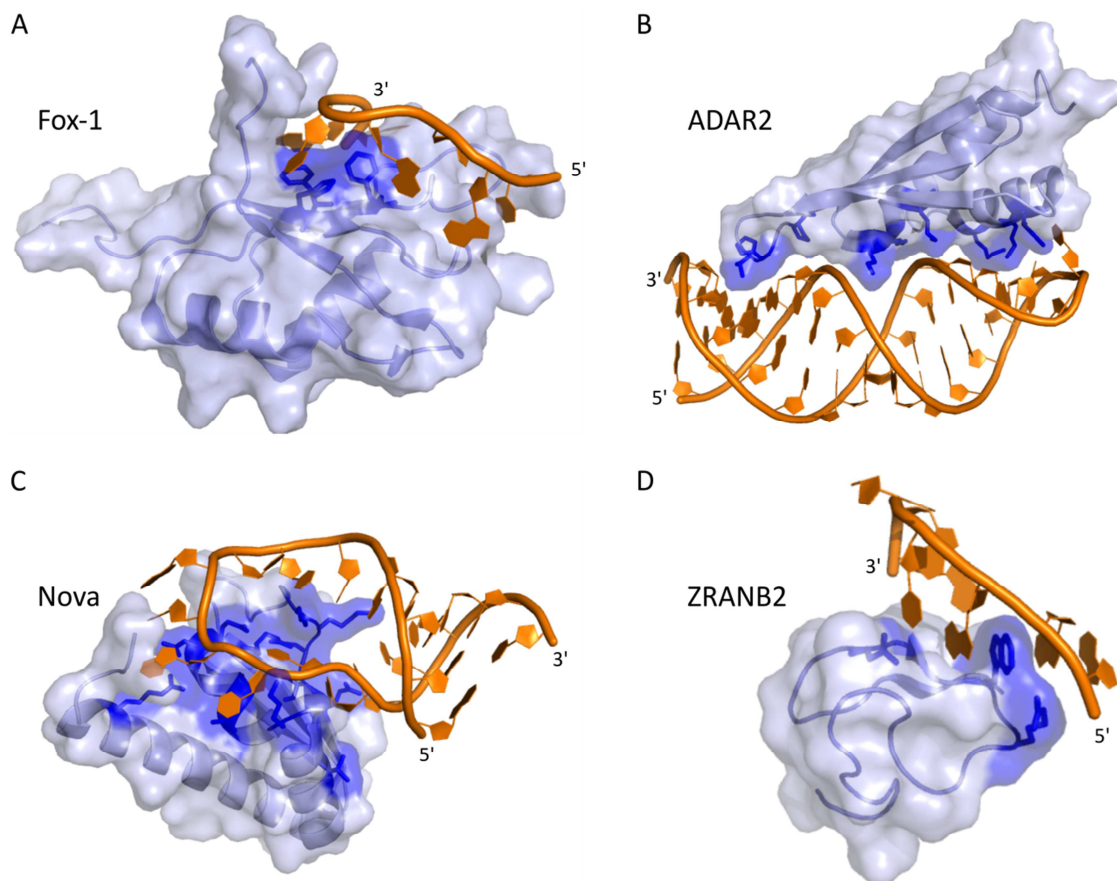


Abbildung 5: Struktur von RNA-Protein Interaktionen

(A) Das RRM des humanen Fox-1 bindet UGCAUGU durch drei konservierte aromatische Reste an der Oberfläche des vier-strängigen β -Faltblattes (PDB: 2err). (B) Die dsRBD von ADAR2 erkennt die doppelsträngige RNA in Form eines Stem Loops (PDB: 2l3c). (C) Die KH Domäne des Nova Proteins bindet einen RNA Stem Loop (PDB: 1ec6). (D) Der Zink-Finger von ZRANB2 bindet an AGGUAA durch Seitenketten-Wasserstoffbrücken und der Bildung einer Guanin-Tryptophan-Guanin-Leiter (PDB: 3g9y). Modifiziert nach (Blythe et al., 2016).

Die genaue Identifizierung der Protein-bindenden Regionen der lncRNAs erweist sich aufgrund der meist noch nicht aufgeklärten Sekundär- und Tertiärstruktur als schwierig. Einige lncRNAs, wie *NEAT1* und *HOTAIR*, weisen mehrere Protein-Bindestellen auf, wodurch lncRNA-abhängige Multimerisierungen von Proteinen vermittelt werden. Im Falle der Scaffold-lncRNA *NEAT1* führt die gleichzeitige Bindung verschiedener Proteine zu einer höheren funktionellen Einheit, den Paraspeckles (Duszczek et al., 2011; Bond and Fox, 2009).

Jedoch konnten aufgrund der noch nicht geklärten RNA-Sekundär- und Tertiärstruktur keine Protein-bindenden Domänen bestimmt werden (Blythe et al., 2016).

Für die lncRNA *HOTAIR* konnten bereits Regionen für die Bindung zweier Proteine kartiert werden. Hierbei wurde gezeigt, dass eine 300 nt lange Region am 5'-Ende von *HOTAIR* für die Interaktion mit PRC2 verantwortlich ist. Hingegen interagiert LSD1 mit einer 646 nt langen Region am 3'-Ende der *HOTAIR* lncRNA (Tsai et al., 2010). Darüber hinaus weist die Sekundärstruktur von *HOTAIR* vier funktionell unabhängige Module auf, wobei zwei dieser Domänen für die zuvor erwähnte Bindung von PRC2 bzw. LSD1 verantwortlich sind. (Somarowthu et al., 2015).

1.5 LncRNA-assoziierte Erkrankungen

Die Pathogenese von Erkrankungen kann auf die Dysregulation von zellulären Prozessen zurückzuführen sein. In Anbetracht der vielfältigen lncRNA-Funktionen im Rahmen der Entwicklung und Homöostasis wird deutlich, dass Mutationen und Dysregulationen von lncRNAs zu einer Verschiebung dieses ausgeglichenen Netzwerkes führen können (Tang et al., 2013). Eine Veränderung der lncRNA Expression oder Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs) konnten bereits mit einer Reihe von Erkrankungen, wie der kardiovaskulären Dysregulation und Krebs assoziiert werden (Boon et al., 2016; Verhaegh et al., 2008; Ahmed et al., 2013b). Des Weiteren können bereits einige lncRNAs, aufgrund ihrer Erkrankungs-assoziierten Expression, als Biomarker für diagnostische Zwecke verwendet werden und stellen ein interessantes therapeutisches Ziel dar (Qi and Du, 2012). Einige Beispiele für lncRNAs welche mit Erkrankungen assoziiert werden sind *BACE1*-Antisense RNA (*BACE1-AS*), *HOTAIR*, Metastasis-associated lung adenocarcinoma 1 (*MALAT1*) und *PANDAR* (Tabelle 1).

Ein erhöhtes Level der lncRNA *BACE1-AS* konnte in Patienten mit Morbus Alzheimer beobachtet werden. *BACE1-AS* ist ein antisense Transkript des Protein-kodierenden Beta-Sekretase1 (*BACE1*) Gens, welches für die Beta Sekretase1 kodiert. Die lncRNA *BACE1-AS* verhindert die Bindung der *miRNA485-5p* an die *BACE1* mRNA, wodurch diese stabilisiert und translatiert wird. Dies führt zur vermehrten Amyloid Precursor Protein (APP) Prozessierung und der Bildung von Amyloid-beta Peptid-Aggregaten (Faghihi et al., 2008, 2010).

Eine *HOTAIR*-Überexpression konnte in verschiedenen Tumoren, wie Leber-, Darm- und Brustkarzinomen, beobachtet werden. *HOTAIR* rekrutiert LSD1 und PRC2, wodurch Histonmarkierungen gesetzt werden. Kommt es nun zu einer *HOTAIR* Überexpression, so

kann dies unter Anderem zu fehlregulierten Histonmodifikationen kommen, wodurch die Genregulation beeinflusst wird (Gupta et al., 2010; Zhang et al., 2015a; Kogo et al., 2011).

Die lncRNA *MALAT1* wird mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert. Beispielsweise korreliert das *MALAT1* Expressionsmuster mit dem Metastasierungsgrad und der Prognose von frühen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Die lncRNA *MALAT1* ist unter anderem in Paraspeckles lokalisiert und an der Regulation des Spleißens von prä-mRNA, durch die Modulation von Serin/Arginin-reichen Spleißfaktoren, beteiligt (Ji et al., 2003; Tripathi et al., 2013; Schmidt et al., 2011).

Eine weitere mit Krebs assoziierte lncRNA ist *PANDAR* welche ausführlich in Kapitel 1.6 beschrieben wird und Gegenstand dieser Arbeit ist.

Tabelle 1: LncRNA-assoziierte humane Erkrankungen

lncRNA	lncRNA-assoziierte Erkrankung	Biologische Funktion	Referenzen
<i>BACE1-AS</i>	Morbus Alzheimer	reguliert BACE1 Expression, durch <i>BACE1</i> mRNA Stabilisierung	(Faghihi et al., 2010, 2008)
<i>HOTAIR</i>	hepatozelluläres Karzinom, kolorektales Karzinom, Mammakarzinom, Glioblastom	Chromatinmodifikationen durch PRC2 und LSD1 Rekrutierung	(Gupta et al., 2010; Kogo et al., 2011; Yang et al., 2011; Zhang et al., 2015a)
<i>MALAT1</i>	nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom, Ovarialkarzinom, hepatozelluläres Karzinom	alternatives Spleißen	(Schmidt et al., 2011; Zhang et al., 2015b; Luo et al., 2006)
<i>PANDAR</i>	Magenkarzinom, hepatozelluläres Karzinom, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Mammakarzinom	Decoy von NF-YA, Chromatinmodifikation durch SAFA und PRC1	(Hung et al., 2011; Puvvula et al., 2014; Sang et al., 2016; Peng and Fan, 2015; Ma et al., 2016; Han et al., 2015)

1.6 lncRNA *PANDAR*

Die lncRNA *PANDAR* (Synonym *PANDA*) wurde durch Hung et al. 2011 im Rahmen einer Analyse von Zellzyklus-Promotoren entdeckt. *PANDAR* wird durch DNA Schaden von dem p53-abhängigen *CDKN1A* Promotor auf Chromosom 6p21.2 transkribiert (Abbildung 6). Die Transkription der 1506 nt langen, nicht-gespleißten *PANDAR* RNA erfolgt in antisense Richtung 4845 bp upstream vom *CDKN1A* Transkriptionsstart. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in humanen Fibroblasten die lncRNA *PANDAR* mit dem Protein NF-YA interagiert, wodurch NF-YA von p53-abhängigen pro-apoptotischen Promotoren abgezogen wird. Während der Zellzyklus-Inhibitor p21, welcher durch das *CDKN1A* Gen kodiert wird, den Zellzyklusarrest vermittelt, begünstigt die lncRNA *PANDAR* durch eine verminderte Transkription apoptotischer Gene das Zellüberleben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die p53-abhängige Induktion von *PANDAR* und *CDKN1A* nicht miteinander gekoppelt ist. Dies spiegelte sich unter anderem in einer erhöhten *PANDAR*-Induktion, im Vergleich zu *CDKN1A* (p21), in metastasierenden Duktalkarzinomen und Zellen mit einer p53 Gain-of-Function Mutation p53^{R273H} wider (Hung et al., 2011).

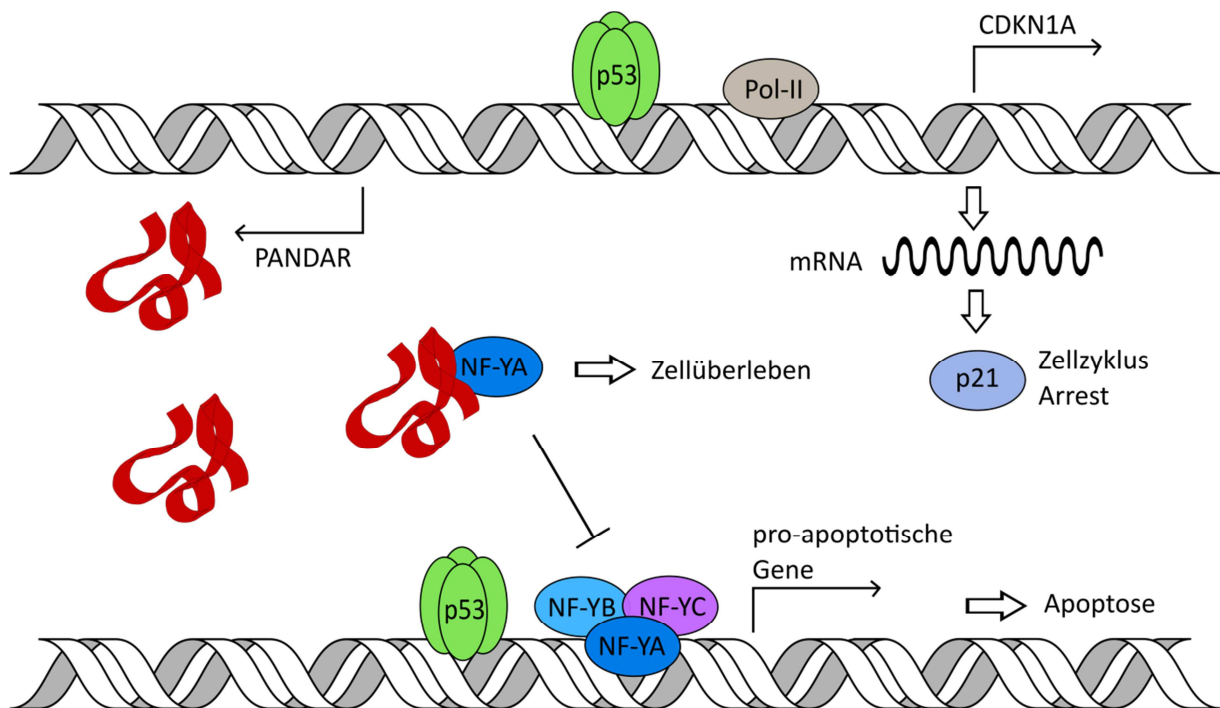


Abbildung 6: Effekt von lncRNA *PANDAR* bei DNA Schaden

Der durch DNA Schaden stabilisierte Tumorsuppressor p53 bindet und initiiert über den *CDKN1A* Promotor die Transkription von *CDKN1A* und nicht-kodierender Transkripte, wie *PANDAR* lncRNA. *PANDAR* interagiert mit NF-YA und verhindert somit die Bindung von NF-Y an p53-abhängige Promotoren für pro-apoptotische Gene. Modifiziert nach (Sotillo and Thomas-Tikhonenko, 2011).

Puvvula et al. konnten zeigen, dass sich die Funktion der lncRNA *PANDAR* in proliferierenden und seneszenten Fibroblasten-Zellen, durch die Interaktion mit verschiedenen interagierenden Proteinen, unterscheidet (Abbildung 7). In seneszenten Zellen sind die lncRNA *PANDAR* und auch pro-seneszente Gene, wie *CDKN1A*, überexprimiert (Abbildung 7A). Hier interagiert *PANDAR* mit dem Transkriptionsfaktor NF-YA, wodurch die Expression von NF-YA-E2F-induzierten proliferationsfördernden Genen verhindert wird. Darüber hinaus führt die p21-vermittelte Aktivierung des Tumorsuppressors Retinoblastoma Protein (Rb) zur Komplexierung von Rb mit E2F-Transkriptionsfaktoren und Co-Repressoren, wie Histon-Methyltransferasen (HMT), Histon-Deacetylasen (HDAC) und Komponenten der RNA-Interferenz (RNAi) Maschinerie, wodurch die Expression der proliferationsfördernden Gene verhindert wird. Im Gegensatz zu seneszenten Zellen, interagiert *PANDAR* in proliferierenden Zellen mit dem Scaffold Attachment Factor A (SAFA; Synonym: hnRNPU), wodurch die Polycomb-Repressiven-Komplexe PRC2 und B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (BMI1)-PRC1 rekrutiert werden (Abbildung 7B). Dies führt durch die repressiven Histonmarkierungen H3K27me3 und H2AK119Ub1 zur Inhibition von pro-seneszenten PRC Zielgenen, wie *CDKN1A* und *PANDAR*. Die lncRNA *PANDAR* agiert hierbei, mit SAFA-BMI1-PRC1, in einem autoregulatorischen Mechanismus, indem sie ihre eigene Expression und somit auch die Funktion des Komplexes reguliert. Die herunterregulierte *PANDAR* RNA-Menge in Kombination mit der niedrigen Affinität zu NF-YA führt dazu, dass NF-YA frei vorliegt, um als Transkriptionsfaktorkomplex gemeinsam mit E2Fs proliferationsfördernde Gene zu aktivieren (Puvvula et al., 2014; Bischof and Puvvula, 2015).

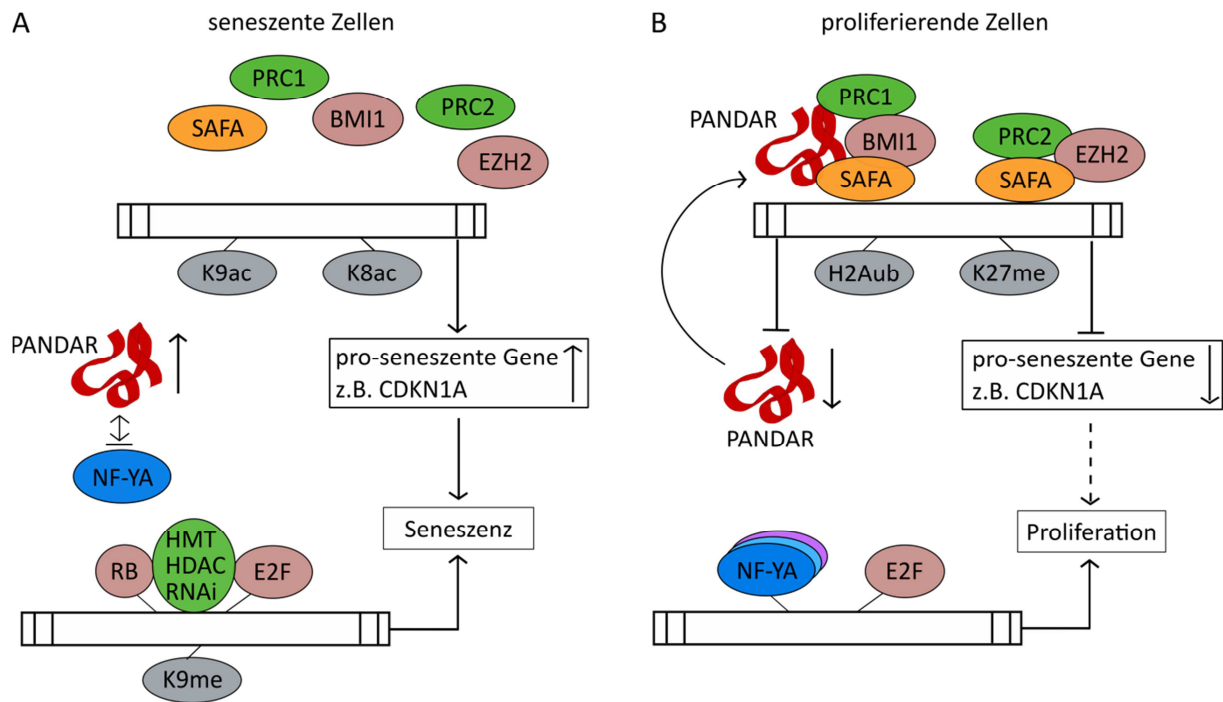


Abbildung 7: Modell der SAFA-PANDAR-PRC-vermittelten Koordination von Seneszenz und Proliferation

(A) In seneszenten Fibroblasten-Zellen ist die Expression von pro-seneszenten Genen, wie *CDKN1A* (p21 Protein) und *PANDAR*, erhöht (hier angedeutet durch H4K8- (K8ac) und H3K9-Acetylierung (K9ac)). Hier interagiert *PANDAR* vorzugsweise mit NF-YA, wodurch die NF-YA-E2F induzierte Expression von proliferationsfördernden Genen verhindert wird. Zusätzlich vermittelt p21 durch die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins Rb, welcher mit E2Fs in Co-Repressor Komplexen (Histon-Methyltransferasen (HMT), Histon-Deacetylasen (HDAC) und Komponenten der RNAi Maschinerie) zusammenlagert und die Expression proliferationsfördernder Gene verhindert, wodurch der seneszente Arrest verstärkt wird. (B) In proliferierenden Fibroblasten-Zellen interagiert *PANDAR* vorzugsweise mit SAFA. Gemeinsam rekrutieren sie PRC2 und BMI1-PRC1 Komplexe, wodurch inhibierende Histonmarkierungen (H3K27me3 und H2AK119Ub1) gesetzt werden und die Transkription von pro-seneszenten PRC Zielgenen, wie *CDKN1A* und *PANDAR*, herunterreguliert wird. Die NF-YA Affinität für *PANDAR* ist gering, wodurch NF-YA mit E2F Transkriptionsfaktoren die Expression von proliferationsfördernden Genen induzieren kann und die Proliferation eingeleitet wird. Wichtige allgemeine Aspekte der Interaktionen sind unter anderem die Expressionslevel der interagierenden Kandidaten im jeweiligen Zellstatus. Modifiziert nach (Puvvula et al., 2014).

Die verschiedenen Funktionsweisen der *PANDAR* lncRNA, aufgrund ihrer interagierenden Partner, deuten auf die unterschiedlichen zellulären Effekte hin, welche eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen spielen können. Dieser Zusammenhang zwischen der *PANDAR* RNA Expression und Tumoren konnte bereits in einer Reihe von Studien beobachtet werden (Han et al., 2015; Ma et al., 2016; Peng and Fan, 2015; Sang et al., 2016; Zhan et al., 2016). Die Analyse von 140 humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) Patientenproben zeigte erniedrigte *PANDAR* lncRNA Level, welche mit vergrößerten Tumorumfängen und erhöhten Tumor-Nodus-Metastasen (TNM)-Stadien korrelierten. Damit einhergehend führte eine *PANDAR* Überexpression *in vitro* und *in vivo* zu

einer verringerten Proliferation von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die *PANDAR* Überexpression, durch die Interaktion mit NF- κ B, die Transkription von *BCL-2* verhindert, was zu einer reduzierten Expression des anti-apoptotisch wirkenden Proteins B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) führt (Han et al., 2015).

Im Gegensatz dazu ergab die Analyse von 100 Magenkarzinom Patientenproben erhöhte *PANDAR* RNA Level im Vergleich zum gesunden benachbarten Gewebe. Diese *PANDAR* Überexpression korrelierte dabei mit einer erhöhten Invasionsrate, fortgeschrittener TNM-Stadien und lymphatischen Metastasen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte *PANDAR* RNA Expression mit einer schlechteren Prognose, hinsichtlich der Überlebensdauer und dem Rezidivrisiko, einhergeht (Ma et al., 2016).

Ähnliche Ergebnisse, hinsichtlich der *PANDAR* Expression, konnten in humanen hepatozellulären Karzinomen (HCC) beobachtet werden. Auch hier zeigte sich ein erhöhtes *PANDAR* RNA Level, welches unter anderem signifikant mit der Gefäßinvasion, erhöhten TNM-Stadien und Leberzirrhose korrelierte. Des Weiteren führte ein *PANDAR* Knockdown in hepatozellulären Karzinom Zelllinien *in vitro* zu einer reduzierter Proliferation und Zellzyklus Progression (Peng and Fan, 2015).

Eine weitere Studie konnte zeigen, dass *PANDAR* in Brustkarzinomgeweben und -zelllinien überexprimiert wird und an der Regulation des G1/S Zellzyklus involviert ist. Diese Regulation war unter anderem bedingt durch die Interaktion von *PANDAR* mit dem Polycomb Komplex Protein BMI1, wodurch BMI1 zu dem *p16^{INK4A}* (Synonym: *CDKN2A*) Promotor rekrutiert wird. Dies wiederum verhindert die Expression des Tumorsuppressors *p16^{INK4A}*, welcher an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist und zum G1/S Zellzyklusarrest beiträgt (Sang et al., 2016).

Ein ähnliches Ergebnis hinsichtlich der Überexpression der *PANDAR* RNA im Vergleich zu gesundem benachbarten Gewebe konnte im Rahmen einer Studie von 55 Blasenkarzinom-Patienten beobachtet werden. Auch hier korrelierte die erhöhte *PANDAR* Expression positiv mit erhöhten TNM-Stadien. Weitere *in vitro* Studien an Blasenkarzinomzellen konnten zeigen, dass die *PANDAR* Überexpression zu einer erhöhten Proliferation führt und die Apoptose unterdrückt (Zhan et al., 2016).

Diese Studien deuten auf die wichtige Bedeutung von *PANDAR* im Zusammenhang mit der Pathogenese und Prognose von unterschiedlichen Tumortypen hin, wodurch die lncRNA als prognostischer Marker bei der Früherkennung und Einstufung des Stadiums nützlich sein kann. Des Weiteren könnte *PANDAR*, durch die Involvierung in der Tumorprogression, ein potenzielles Therapietarget darstellen.

1.7 Nuklear Transkription Faktor Y

Der Nuklear Transkription Faktor Y (NF-Y) ist ein heterotrimerer Transkriptionsfaktor, der an CCAAT Boxen in eukaryotischen Promotoren bindet und die Transkription reguliert (Mantovani, 1999). Der in Eukaryoten hoch konservierte NF-Y Komplex besteht aus der sequenzspezifischen DNA-bindenden Untereinheit NF-YA und dem Heterodimer NF-YB/YC (Romier et al., 2003; Nardini et al., 2013; Imbriano et al., 2005). Nach der Bildung des Heterodimers von NF-YB und NF-YC, über ihre Histone fold domains (HFD), lagert sich NF-YA, mittels subunit association domain (SAD), an und ermöglicht so die Bindung an das CCAAT Promotor-Element mittels DNA Binde-Domäne (DBD) (Abbildung 8A). Die Kristallstruktur der evolutiv konservierten Domänen des NF-Y Komplexes mit einem 25 bp langen CCAAT-Box enthaltenden Oligonukleotid-Duplex zeigt die NF-Y-DNA-Interaktion (Abbildung 8B). Die Bildung des trimeren Komplexes erfolgt über die N-terminale α -Helix von NF-YA in die negative geladene Bindegroße des NF-YB/-YC Heterodimers, wobei der Komplex durch die polaren und/ oder positiv geladenen Reste von NF-YA stabilisiert wird. Die sequenzspezifische DNA-Erkennung und Bindung erfolgt durch die Insertion der C-terminalen NF-YA α -Helix in die kleine DNA-Bindegroße mit CCAAT-Element. Darüber hinaus interagiert die basische Oberfläche des NF-YB/-YC Heterodimers über Van der Waals und elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Zuckerphosphatrückgrat (Nardini et al., 2013).

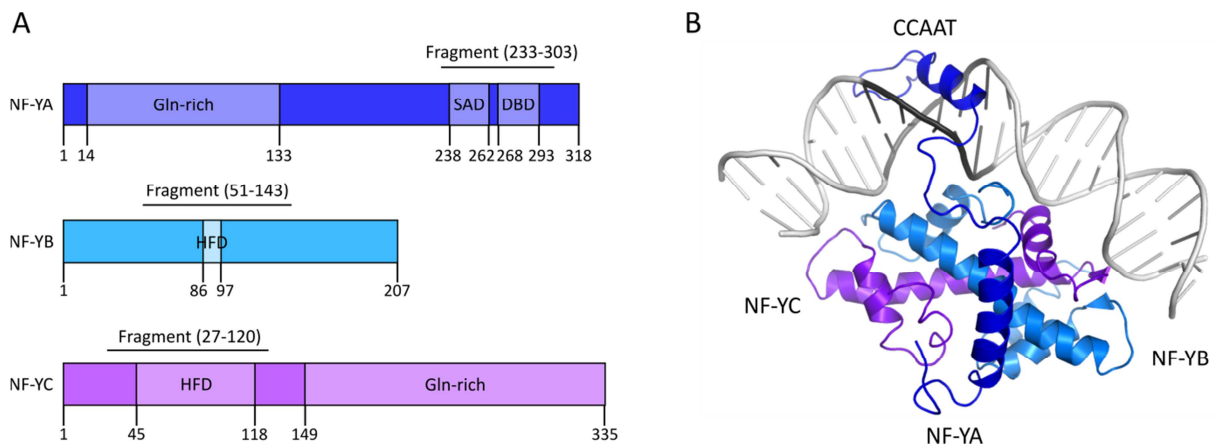


Abbildung 8: Aufbau des NF-Y trimeren Komplexes

(A) Die NF-Y Untereinheiten NF-YB (cyanblau) und NF-YC (violett) bilden über die Histone fold domains (HFD) ein Heterodimer, an welches die NF-YA Untereinheiten (dunkelblau) mittels subunit association domain (SAD) bindet. Die Bindung von NF-YA an die DNA wird durch die DNA Binde-Domäne (DBD) vermittelt. NF-YA und NF-YC enthalten eine Glutamin-reiche Transaktivierungs-Domäne (Gln-rich). Die Fragmentgrenzen markieren die in der Kristallstruktur verwendeten Fragmente. (B) Die Struktur des NF-Y Trimers zeigt die Interaktion der Untereinheiten miteinander und die Bindung von NF-YA an das CCAAT Element in der DNA Bindegroße. NF-YA: P23511-2, NF-YB: P25208-1, NF-YC: Q13952-2; PDB: 4awl

Die sequenzspezifische Bindung des NF-Y Trimers an Promotorregionen mit CCAAT-Element spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression und reguliert somit eine Reihe von Prozessen. Die CCAAT Box ist einer der ersten entdeckten Cis-wirkenden Promotorelemente und befindet sich in sense oder antisense Richtung 60 bis 100 bp vor dem Transkriptionsstart (TSS) (Mantovani, 1998, 1999). Die CCAAT Box befindet sich in einer Vielzahl von Genen, die beispielsweise in der Regulation von DNA Schaden und Zellzyklus beteiligt sind oder auch in Genen die in Tumorzellen überexprimiert werden (Dolfini et al., 2009; Hu et al., 2002; Dolfini et al., 2016; Benatti et al., 2008).

Die Komplexität des Transkriptionsfaktors NF-Y wird durch das Vorkommen mehrerer Isoformen der Untereinheiten NF-YA und NF-YC, mit verschiedenen Funktionen und Expressionsleveln in unterschiedlichen Geweben, zusätzlich erweitert. Darüber hinaus führen posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinylierung, zu einer nochmals komplexeren NF-Y Biologie (Dolfini et al., 2012, 2016). Die Bindung von NF-Y an DNA kann das Histonmodifikationsmuster, die Bindung und Rekrutierung von anderen Transkriptionsfaktoren und Co-Aktivatoren oder auch die Funktion der RNA Polymerase II-Maschinerie beeinflussen (Benatti et al., 2015; Dolfini et al., 2009; Nardini et al., 2013). Dies führt zur Regulation von Zielgenen, die in Prozessen wie Zellzyklus, Apoptose und der Zellantwort nach DNA Schaden involviert sind (Nardini et al., 2013; Benatti et al., 2008). In proliferierenden Zellen reguliert NF-Y den Zellzyklus-Verlauf, während in differenzierten und seneszenten Zellen die Aktivität von NF-Y häufig herunterreguliert ist (Benatti et al., 2011; Oldfield et al., 2014; Bungartz et al., 2012; Matuoka and Yu Chen, 1999; Farina et al., 1999). Eine Ebene der Aktivitätsregulation von NF-Y stellt die lncRNA *PANDAR* dar, in dem sie mit NF-YA interagiert und somit die Bindung von NF-Y an Promotorregionen verhindern kann (Kapitel 1.6) (Hung et al., 2011; Puvvula et al., 2014).

2. Zielsetzung

Lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) sind aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen in einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, sodass eine Dysregulation zu pathologischen Effekten führen kann (Tang et al., 2013; Boon et al., 2016). Ein Beispiel stellt die lncRNA *PANDAR* dar, welche in einer Reihe von Tumoren überexprimiert wird (Ma et al., 2016; Peng and Fan, 2015; Sang et al., 2016; Zhan et al., 2016). Die lncRNA *PANDAR* ist eine 1506 nt lange antisense RNA, welche p53-abhängig vom *CDKN1A* Promotor transkribiert wird. Auf molekularer Ebene konnte bereits gezeigt werden, dass die lncRNA *PANDAR* mit den Proteinen NF-YA und SAFA interagiert, wodurch nachfolgend die Transkription beeinflusst wird (Hung et al., 2011; Puvvula et al., 2014).

Ziel dieser Promotionsarbeit war zum einen die Untersuchung des *PANDAR*-Expressionslevels in einem Zellpanel humaner Zelllinien und zum anderen die Analyse neuer und bereits bekannter *PANDAR*-Protein-Interaktionspartner. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Expression der lncRNA *PANDAR* je nach Zellstatus variiert (Hung et al., 2011; Puvvula et al., 2014), galt es das endogene und durch DNA-Schaden induzierte *PANDAR*-Expressionsprofil in humanen Zelllinien zu untersuchen. Darüber hinaus sollte der Effekt eines *PANDAR* Knockdowns hinsichtlich der Zellviabilität überprüft und eine *PANDAR* überexprimierende Zelllinie für fortführende Zellexperimente etabliert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit umfasste die Analyse des RNA-Bindemotivs und -modus an den Transkriptionsfaktor NF-Y. Hierfür sollten die NF-Y Fragment-Untereinheiten heterolog exprimiert, aufgereinigt und die Bindung der lncRNA *PANDAR* untersucht werden. Nachfolgend sollte das RNA-Bindemotiv von NF-YA mittels PAR-CLIP identifiziert und durch nachfolgende Mutationsstudien validiert werden.

Aufgrund der zwei bereits bekannten *PANDAR*-interagierenden Proteine sollten weitere mögliche *PANDAR*-Interaktionspartner untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden gegen *PANDAR* gerichtete PNA-Sonden designt, synthetisiert und charakterisiert. Weiterführend ermöglichen diese *PANDAR*-PNA-Sonden die Identifizierung der *PANDAR*-interagierenden Proteine. Hierfür sollte im Rahmen eines PNA-basierten SILAC-Experiments mit nachfolgender massenspektrometrischen Analyse der Proteine, die mittels *PANDAR* RNA angereichert werden, erfolgen. Nachfolgende Validierungen sollten der Verifizierung der im SILAC ermittelten Proteinkandidaten dienen. Des Weiteren sollte ermittelt werden, in wie weit die lncRNA *PANDAR* die Funktion eines im alternativen Spleißen involvierten identifizierten *PANDAR*-interagierenden Proteins beeinflusst.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 2: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
2 ml Ni ²⁺ NTA- Affinitätschromatographie-Säule	GE Healthcare
20 ml GSH- Affinitätschromatographie-Säule	GE Healthcare
AlphaImager Safire2	Tecan
Chromatographie-System	Äkta Purifier Explorer und Pure
Feinwaage	Sartorius
Gradient PCR	Eppendorf
HiLoadTM 16x60 S75- Säule	GE Healthcare
HiLoadTM 26x60 S75- Säule	GE Healthcare
HPLC	Shimadzu
HPLC-MS	Agilent Technologies
Inkubator	Binder
Kationen-Austauschchromatographie HiTrap SP HP Säule	GE Healthcare
Mikroskop Axiovert	Zeiss
Mini-PROTEAN Tetra-System (SDS-PAGE)	BioRad
NanoDrop Spectrometer ND-100	PeqLab
Peristaltikpumpe MCP process IP65	ISMATEC
Real Time PCR 7500Fast	Applied Biosystems
Rotoren JA-10, JA-25.50	Beckman-Coulter
Schüttler	Infors Hat
SemiDry Western Blot	BioRad
Sterilbank	Hera Safe
Superdex TM 75 (HiLoadTM 10/30)	GE Healthcare
Superdex TM 75 (HiLoadTM 16/60)	GE Healthcare
Zellaufschluss_Hochdruckhomogenisator	Microfluidics Corporation
Zellkultur-Inkubator	HERA Safe
Zentrifugen	Eppendorf
Zentrifugen Avanti	Beckman-Coulter

3.1.2 Materialien

Tabelle 3: verwendete Software

Software	Firma
7500 Software v2.0.6	Applied Biosystems
Axiovision SE64 Rel.4.8	Zeiss
ChemBioDraw Ultra 14.0	Perkin Elmer
Image J	Entwickler Wayne Rasband
Inkscape	GPL
Mendeley	Mendeley
mfold	http://unafold.rna.albany.edu
Microsoft Office Paket	Microsoft
Prism	GraphPad
Pymol	Schrödinger Inc.
Snap Gene Viewer	GSL Biotech LLC

Tabelle 4: verwendete Einwegartikel

Materialien	Firma
CORNING assay plates (384)	Corning
Filterspitzen	Sarstedt
Finntips50	Thermo Lab
Pipettenspitzen (1-10 µl, 10-200 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen 1250 µl	Biozym
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Real Time PCR Platten und Folie	Kisker Biotech
Serologische Pipetten	Sarstedt
Zellkulturschalen	Sarstedt

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth und Sigma Aldrich bezogen. Ausnahmen sind nachfolgend aufgeführt (Tabelle 5).

Tabelle 5: verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/ Reagenzien	Firma
Biotin	Sigma Aldrich
Biotin-RNA Labelling Mix 10x	Roche
dNTPs	Bioline
DPBS Pulver	PAN Biotech
Fluorescein Isothionat (FITC)	Sigma Aldrich
GFP-MA Trap Beads	Chromotek
Lipofectamin 2000	Invitrogen
NTPs	Thermo Scientific
Primer/ Oligos	IDT

Chemikalien/ Reagenzien	Firma
Fmoc-PEG4380 und Fmoc-PEG1	Iris
PNA Bausteine	Link Technologies
Streptavidin Magnetic Beads	NEB und Thermo Scientific
TriFECTa RNAi Kit	IDT
TRIstore	Bioline
Viromer Green	Lipocalyx

Tabelle 6: verwendete Medien und Lösungen

Medien und Lösungen	Firma
Nicht essentielle Aminosäuren	PAN Biotech
DMEM	PAN Biotech
Trypsin	PAN Biotech
FCS	PAN Biotech
Optimem	Gibco
LB	MPI Facility
TB	MPI Facility
SOC Medium	MPI Facility
Agarplatten	MPI Facility

Tabelle 7: verwendete Enzyme und Enzymlösungen

Enzyme und Enzymlösungen	Firma
Antarctic Phosphatase	NEB
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (10x Terminormix)	Applied Biosystems
BP-Clonase	Invitrogen
DNase	AppliChem
DNase (RNase frei)	NEB
LR-Clonase	Invitrogen
Lysozym	Sigma
My Taq Mix	Bioline
PfuCX	hausintern hergestellt
Prescission	hausintern hergestellt
Proteinase K	Invitrogen
Pyrophosphatase	Thermo Scientific
Quanti Tect Rev. Transcription Kit	Qiagen
Restriktionsenzyme	NEB
RNase A/T	Roche
SensiMix SYBR Low Rox	Bioline
T4 DNA Ligase	NEB
T4 DNA Polymerase	NEB
T7-RNA Polymerase	hausintern hergestellt
T7-RNA Polymerase Kit	Thermo Scientific

Tabelle 8: Real Time PCR Primer

Primer	Sequenz (5'→ 3')
PANDAR_qPCR_5'	TGCACACATTTAACCCGAAG
PANDAR_qPCR_3'	CCCCAAAGCTACATCTATGACA
NF-YA_qPCR_5'	GCAGGACAGATTTCAGCAGCA
NF-YA_qPCR_3'	ATGGGTTGGCCAGTTGATGT
BCL-XS_qPCR_5'	GAGCTTTGAACAGGATACTTTTGTGG
BCL-XS_qPCR_3'	GAAGAGTGAGCCCAGCAGAAC
GAPDH_qPCR_5'	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH_qPCR_3'	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

Tabelle 9: Antikörper

Antikörper	Firma
Mouse anti-NF-YA	Santa Cruz Biotechnology sc-17753
Rabbit anti-hnRNPUL1	Proteintech 10578-1-AP
Rabbit anti-SAFA	Proteintech 14599-1-AP
Rabbit anti-U2AF65	Proteintech 15624-1-AP
Rabbit anti-PTBP1	Proteintech 12582-1-AP
Mouse anti-β Aktin	Santa Cruz Biotechnology sc-47778
Rabbit anti-GFP Tag	Eurogentec AS-29779
Goat anti-Mouse AP linked	Cell Signaling Technology 7056
Goat anti-Rabbit AP linked	Santa Cruz Biotechnology sc-2007

Tabelle 10: humane Zelllinien

Zelllinie	Gewebe	p53 Status	Erkrankung
A549	Lunge	Wildtyp	Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
BJ	Vorhaut	Wildtyp	-
BJ mut (H-Ras ^{G12V} SV40TL htert)	Vorhaut	Wildtyp (SV40TL hindert p53 an der DNA-Bindung)	-
DU145	Prostata	heterozygot p53 ^{P223L} p53 ^{V274F}	Karzinom
HCT116	Kolon	Wildtyp	Karzinom
HepG2	Leber	Wildtyp	Hepatozelluläres Karzinom
HT29	Kolon	homozygot p53 ^{R273H}	Karzinom
MCF7	Brust	Wildtyp	Adenokarzinom
U2OS	Knochen	Wildtyp	Osteosarkom
U373	Gehirn	homozygot p53 ^{R273H}	Glioblastom, Astrozytom
U87	Gehirn	Wildtyp	Glioblastom, Astrozytom

Tabelle 11: Liste der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E.coli</i> DH5 alpha	F-Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) [malB ⁺] _{K-12} (λ ^S)
<i>E.coli</i> BL21(DE3)pRIL	F- ompT hsdS(r-B m-B) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]

Tabelle 12: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Referenz
pDONR201-Gateway	Invitrogen
pcDNA3.1-eGFP-Transfektionskontrolle	Sven Hennig
pcDNA3.1-eGFP-Transfektionskontrolle	Sven Hennig
pcDNA3.1-eGFP-HA-Gateway	Sven Hennig
pENTR-Matrin3	Sven Hennig
pENTR-U2AF1	Sven Hennig
pENTR-U2AF2	Sven Hennig
pDONR201-PTBP1	Diese Arbeit
pDONR201-DHX9	Diese Arbeit
pDONR201-FUBP3	Diese Arbeit
pDONR201-TIAL1	Diese Arbeit
pDONR201-PSPC1	Diese Arbeit
pDONR201-STAU1	Diese Arbeit
pDONR201-Hist1H1A	Diese Arbeit
pDONR201-RPS24	Diese Arbeit
pDONR201-hnRNPUL1	Diese Arbeit
pDONR201-DAZAP	Diese Arbeit
pDONR201-Elf2AK2	Diese Arbeit
pDONR201-Hist1H1E	Diese Arbeit
pDONR201-LIG3	Diese Arbeit
pDONR201-RBMS2	Diese Arbeit
pDONR201-SAFA	Diese Arbeit
pDONR201-NF-YA	Diese Arbeit
pDONR201-NF-YB	Diese Arbeit
pDONR201-NF-YC	Diese Arbeit
pDest-eGFP-CELF	Addgene 61276
pDEST-eGFP-MBNL1	Addgene 61277
pcDNA3-HTRA2-eGFP	Addgene 14121
pcDNA3-eGFP-HA-Matrin3	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-U2AF1	Diese Arbeit

Plasmid	Referenz
pcDNA3-eGFP-HA-U2AF2	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-PTBP1	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-DHX9	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-FUBP3	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-TIAL1	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-PSPC1	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-STAU1	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-Hist1H1A	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-RPS24	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-hnRNPUL1	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-DAZAP	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-Elf2AK2	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-Hist1H1E	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-LIG3	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-RBMS2	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-SAFA	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-NF-YA	Diese Arbeit
pcDNA3-YFP-HA-NF-YA	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-NF-YB	Diese Arbeit
pcDNA3-eGFP-HA-NF-YC	Diese Arbeit
pcDNA3-YFP- Transfektionskontrolle_PANDAR	Diese Arbeit
pGex-6p2-NF-YA233-303	Philine Hagel
pACYC-Duet NF-YB51-143_NF-YC27-120	Philine Hagel
pAV-5S-t-Lys-Spinach-t-Lys	Samie Jeffrey Lab
pAV-5S-t-Lys-Spinach-t-Lys-PANDAR	Diese Arbeit

Tabelle 13: Liste der verwendeten DsiRNAs

DsiRNA	Duplexsequenz (<i>DNA</i> , RNA)
5'TYE563-Transfektionskontrolle	5' - <u>TCCU</u> UCCUCUCUUUCUCUCCCUUGU <u>G</u> A-3' 3' - <u>AGGA</u> AAGGAGAGAAAGAGAGGGGAACACU-5'
HPRT- Positivkontrolle	5' - GCCAGACUUUGUUGGAUUUGAA <u>TT</u> -3' 3' - UUCGGUCUGAAACAACCUAAACUUUAA-5'
NC1-Negativkontrolle	5' - CGUUAUUCGCGUAUAAUACGCGU <u>AT</u> -3' 3' - CAGCAAUUAGCGCAUUAUUGCGCAUA-5'
PANDAR_DsiRNA_1	5' - AAUGUGUGCACGUAACAGAGCGC <u>AT</u> -3' 3' - AUUUACACACGUGCAUUGUCUCGCGUA-5'
PANDAR_DsiRNA_2	5' - GGGCAUGUUUUCACAGAGGGGCC <u>AG</u> -3' 3' - GACCCGUACAAAAGUGUCUCCCCGGUC-5'
PANDAR_DsiRNA_2	5' - GAGAUUUGCAGCAGACACAAUGG <u>CT</u> -3' 3' - GACUCUAAACGUCGUCUGUGUUACCGA-5'

Tabelle 14: Liste der verwendeten Kits

Kit	Firma
Direct-zol™ RNA MiniPrep	ZymoResearch
E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit	Omega Bio-Tek
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	Omega Bio-Tek
E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit	Omega Bio-Tek
Quick RNA Micro/Mini Prep Kit	ZymoResearch
RNA Clean & Concentrator™-5	ZymoResearch

3.1.3 Puffer

Tabelle 15: Puffer für RNA

RNase Dekontamination	0,1 M NaOH 1 mM EDTA In DEPC-behandeltem H ₂ O, anschließend autoklaviert
RNA Strukturpuffer	10 mM MgCl ₂ 10 mM Tris-HCl pH 7,0 100 mM KCl
FP Puffer	10 mM HEPES pH 7,5 150 mM NaCl 0,1 mM EDTA 0,01% Tween20
10x Transkriptionspuffer	500 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM MgCl ₂ 50 mM DTT 20 mM Spermidin

Tabelle 16: Puffer für Pull-Down Experimente

RIPA-Puffer	1% (v/v) NP40 150 mM NaCl 0,1% (w/v) SDS 50 mM Tris-HCl pH 8,0 1x Protease Inhibitor Cocktail (frisch dazu) 1 mM PMSF (frisch dazu)
Pull Down Puffer GFP Trap MA-Beads	10 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 1x Protease Inhibitor Cocktail (frisch dazu)
Pull Down Puffer Streptavidin mag.-Beads	10 mM HEPES pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 1x Protease Inhibitor Cocktail (frisch dazu)

Tabelle 17: Puffer für SDS-PAGE und Western Blot

1xSDS Laufpuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% SDS
5xSDS Probenpuffer	250 mM Tris pH 6,8 10% (w/v) SDS 50% Glycerin 25% β -Mercaptoethanol 1% Bromphenolblau
SDS-Sammelgelpuffer	500 mM Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
Tricin-Gel-Puffer	3 M Tris-HCl pH 8,5 0,75% (w/v) SDS
1x Anodenpuffer	0,2 M Tris pH 8,9
1x Kathodenpuffer	100 mM Tris 100 mM Tricin 0,1% SDS
Coomassie Färbelösung	40% (v/v) EtOH 0,3% (w/v) Coomassie R250 0,3% (w/v) Coomassie G250
Entfärberlösung	50% (v/v) EtOH 10% (v/v) Essigsäure
Transferpuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0 192 mM Glycin 0,1% SDS 20% Methanol
TBS-T	10 mM Tris-HCl pH 7,6 150 mM NaCl 0,05% Tween20
Blockierlösung	5% (v/v) Milchpulver TBS-T

Tabelle 18: Puffer für Agarosegele

5xDNA Probenpuffer	50% (w/v) Glycerin 0,2% (w/v) Orange G in 1x TAE-Puffer
50xTAE Puffer	2 M Tris 0,05 M EDTA pH 8,0 57,1 ml/l Essigsäure

Tabelle 19: Puffer für NF-YA Aufreinigung

Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 (4°C) 400 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA pH 8,0 5 mM β-Mercaptoethanol 1 mM PMSF (frisch dazu) 1x Protease Inhibitor Cocktail (frisch dazu) Spatelspitze DNase (frisch dazu)
Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 (4°C) 400 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA pH 8,0 5 mM β-Mercaptoethanol
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 (4°C) 400 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 10 mM GSH
Gelfiltrationspuffer	25 mM HEPES pH 8,0 (4°C) 400 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 2 mM DTT (frisch dazu)

Tabelle 20: Puffer für NF-YB/NF-YC Aufreinigung

Lysepuffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 (4°C) 400 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM PMSF (frisch dazu) Spatelspitze DNase (frisch dazu)
Waschpuffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 (4°C) 400 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM PMSF (frisch dazu) 2, 10, 5 oder 25mM Imidazol
Waschpuffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 (4°C) 400 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM PMSF (frisch dazu) 250 mM Imidazol
Gelfiltrationspuffer	10 mM Tris pH 8,0 400 mM NaCl 2 mM DTT (frisch dazu)

Tabelle 21: Puffer für EMSA und REMSA

10xTBE Puffer	880 mM Tris 900 mM Borsäure 500 mM EDTA pH 8,0 pH nicht einstellen
5xBindingbuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 750 mM KCl 2,5 mM EDTA pH 8,0 62,5% Glycerin 1 mM DTT (frisch) 0,5 mM PMSF (frisch)

Tabelle 22: Puffer für PAR-CLIP

Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0)	4,7 g Citronensäuremonohydrat 9,2 g Na ₂ HPO ₄ (7H ₂ O) in H ₂ O
NP40-Lysepuffer	50 mM HEPES-KOH pH 7,5 150 mM KCl 2 mM EDTA-NaOH pH 8,0 1 mM NaF 0,5% (v/v) NP40 1x Protease Inhibitor Cocktail (frisch dazu)
IP Waschpuffer	50 mM HEPES-KOH pH 7,5 300 mM KCl 0,05% (v/v) NP40 0,5 mM DTT (frisch dazu) 1x Protease Inhibitor Cocktail (frisch dazu)
Crosslink Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 20 mM EGTA 0,5% (v/v) NP40
PNK Puffer (ohne/ mit 5 mM DTT)	50 mM Tris-HCl pH 7,5 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ *6H ₂ O
RNA Ligase Puffer (ohne/ mit 2 mM ATP)	0,5 M Tris-HCl pH7,5 0,1 M MgCl ₂ *6H ₂ O 0,1 M 2-Mercaptoethanol 1mg/ml BSA
2x Proteinase K Puffer	100 mM Tris-HCl pH7,5 150 mM NaCl 12,5 mM EDTA 2% (w/v) SDS
2x Formamid-Ladepuffer	50 mM EDTA-NaOH pH 8,0 0,05% (w/v) Bromphenolblau 80% (v/v) Formamid

2 Gele Dicke von 0,75 mm (Biorad)

Tabelle 23: SDS-Gel Zusammensetzung

	Trenngel 12%	Sammelgel
Acrylamid 30%	4 ml	0,85 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,5 ml
H ₂ O	2,25 ml	1,6 ml
SDS (20%)	0,05ml	0,025 ml
APS (10%)	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,01 ml	0,005 ml

Tabelle 24: Tricin-Gel Zusammensetzung

	Trenngel 12%	Sammelgel
Acrylamid 30%	3,924 ml	0,85 ml
Tricin-Gel-Puffer	3,33 ml	1,24 ml
H ₂ O	0,686 ml	3,11 ml
Glycerin (50%)	2 ml	-
APS (10%)	0,05 ml	0,033 ml
TEMED	0,01 ml	0,004 ml

Tabelle 25: Natives Polyacrylamidgel Zusammensetzung

	Gel 10%
Acrylamid 30%	4,8 ml
10x TBE Puffer	1,25 ml
H ₂ O	17,1 ml
APS (10%)	0,25 ml
TEMED	0,025 ml

3.2. Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank durchgeführt. Bei den verwendeten Arbeitsgeräten, handelte es sich um autoklavierte Materialien und Lösungen bzw. um sterile Einwegartikel.

3.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die zu kultivierenden Zellen wurden in unbeschichteten Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturplatten mit DMEM+ 10% FCS bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Zu Beginn eines Versuchsansatzes oder einer jeden Passage wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von 0,05% Trypsin/EDTA (Inkubation im Brutschrank) vom Boden der Kulturgefäße abgelöst. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von FCS-haltigem Kulturmedium. Die erhaltene Zellsuspension wurden in ein 15 ml Tube überführt, bei 200 rcf für 3 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden je nach gewünschter Dichte ausgesät.

3.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Zum Konservieren der Zellen für einen längeren Zeitraum, wurden diese in ein kryoprotektives Medium gegeben und in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen wie im Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben behandelt. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen, je nach gewünschter Konzentration, mit der entsprechenden Menge Einfriermedium (Zellkulturmedium+ 10% DMSO) resuspendiert und in Kryogefäße überführt. Zum langsamen Abkühlen wurden sie über Nacht im Isopropanol-Einfriergefäß bei -80 °C gelagert und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.1.3 Auftauen von Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen, auf Eis gelagert und in einem 37°C warmen Wasserbad bis zum Auftauen der Zellsuspension aufgetaut, in 3 ml Zellkulturmedium aufgenommen, bei 200 rcf für 3 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und in eine Zellkulturschale überführt.

3.2.1.4 Ermittlung der Zellzahl

Die Zählung der Zellen erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension entnommen und mit 10 µl 0,4 %-iger Trypanblau-Lösung versetzt. Das Gemisch wurde in die Zählkammer gegeben und die in den 4 großen Quadraten befindlichen Zellen ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich nach folgender Rechnung (Formel 1):

Formel 1: Berechnung der Zellzahl (Neubauer Zählkammer)

$$\text{Zellzahl/ml} = \bar{x} \text{ aus 4 Großquadraten} \cdot 10^4 \cdot 1,2$$

3.2.1.5 Transiente und stabile DNA-Transfektion

Für die Transfektion von Plasmiden in Säugetierzellen wurde die gewünschte Zellzahl ausplattiert und am darauffolgenden Tag mit Lipofectamin 2000 (Life Technologies) nach Herstellerangaben transfiziert. Transiente Transfektionen wurden je nach Experiment für 24 oder 48 h inkubiert.

Für die stabile Transfektion monoklonaler Zellen wurde zuvor, in nicht transfizierten Zellen, die Geneticin-Resistenz analysiert und die Konzentration gewählt bei der die Zellen nicht mehr überlebten. Nach 48 h Transfektion wurden die Zellen dünn in eine 10 cm Kulturschale überführt und mit Geneticin-haltigem Medium selektiert. Nach klonaler Expansion der vereinzelter Zellen wurden diese mit 0,005% Trypsin behandelt, sodass die Zellen ein wenig von der Zellschale abgelöst wurden, jedoch im klonalen Zellverband blieben. Mit einer Pipetten wurde dieser Zellverband, unter mikroskopischer Beobachtung, vorsichtig aufgenommen und in eine 96-Well mit 100 µl Medium überführt. Die Klone wurden weiter unter Geneticin-Selektion expandiert und im Anschluss hinsichtlich der stabilen Transfektion analysiert.

3.2.1.6 siRNA-Knockdown

Der siRNA Knockdown an U2OS Zellen wurde mit dem TriFECTa Dicer Kit von IDT durchgeführt. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden U2OS Zellen in eine 24 Well Platte ausplattiert und am darauffolgenden Tag mit der TYE 563 DS Transfektionskontrolle mit Viromer Green (Lipocalyx) transfiziert. Hierfür wurde 0,55 µl Viromer Green in 49,45 µl Puffer F mit 5 pmol siRNA Duplex für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und zu den Zellen (500 µl Kulturmedium) gegeben. Nach 24 h konnte in annähernd jeder Zelle der Farbstoff mikroskopisch beobachtet werden. Die weitere Validierung der siRNA Duplexe (Positivkontrolle (HPRT), Negativkontrolle (NC1), *PANDAR* siRNA1, *PANDAR* siRNA2 und

PANDAR siRNA3) wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt und mittels quantitativer Real Time PCR hinsichtlich des RNA-Levels validiert.

3.2.1.7 Doxorubicin Behandlung

Doxorubicin Hydrochlorid (579,8 g/mol) wurde in H₂O gelöst (1 mg/ml) und je nach Experiment in der gewünschten Konzentration bzw. Inkubationsdauer zu den Zellen gegeben.

3.2.1.8 Zellviabilitäts- und Zellproliferations-Assay (WST-1 und Kristallviolett)

Zur Analyse der Zellviabilität und Proliferation wurden je 5000 Zellen in 100 µl in eine Vertiefung einer 96er Kulturschale ausplattiert. Die Untersuchung der Zellviabilität erfolgte mittels WST-1 Assay (water soluble tetrazolium). Dieser wurde nach Herstellerangaben (Roche Applied Science) durchgeführt. Der Farbumschlag des enzymatisch umgesetzten Tetrazoliumsalzes zu Formazan wurde bei 690 nm und 450 nm am Safire2 gemessen, wobei der Delta-Wert ($\Delta 690\text{nm} - 450\text{nm}$) ermittelt wurde.

Für die Analyse der Zellproliferation wurde der Kristallviolett Assay verwendet. Nach erfolgter Behandlung und Inkubation der Zellen, wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 min mit jeweils 75 µl 4 % PFA (in PBS) fixiert. Nach dem Entfernen der Fixierlösung folgte die Färbung mit 0,1 % Kristallviolett (in Aqua dest.) für 25 min, das Auswaschen der Farbrückstände aus den Wells mit Wasser und die Permeabilisierung der Zellmembran mit je 70 µl 0,2 % Triton (in PBS). Anschließend wurde die Platte auf dem Schüttler belassen, bis sich der Farbstoff aus den Zellen gelöst hatte. Die Extinktion wurde bei 540 nm am Safire2 gemessen.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA Isolierung und Aufreinigung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde zum einen das RNA Mini und Micro Prep Kit der Firma ZymoResearch und die Methode der Chloroform-Phenol Extraktion mit TRIsure der Firma Bioline nach Herstellerangaben verwendet. Für die Chloroform-Phenol Extraktion wurde ein zusätzlicher Phasentrennungsschritt der RNA-haltigen wässrigen Phase mit Chloroform hinzugefügt. Die Bestimmung der RNA Konzentration wurde am NanoDrop gemessen. Die RNA wurde bei –80°C gelagert.

3.2.2.2 cDNA Synthese

Für die cDNA (komplementären DNA) Synthese wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Für die Eliminierung eventueller genomischer DNA wurde die gewünschte RNA-Menge mit G-Wipeout Puffer für 8 min bei 42°C inkubiert. Die Herstellung der cDNA erfolgte für 30 min bei 42°C mit anschließender Inaktivierung der Enzyme bei 95°C für 3 min.

3.2.2.3 quantitative Real Time PCR

Zur quantitativen Analyse der Transkripte wurde die hergestellte cDNA mit den gewünschten Primern mittels Real Time PCR untersucht und mittels $\Delta\Delta CT$ Methode analysiert. Hierfür wurde der 2xSensiMix SYBR Low-ROX Mix der Firma Bioline verwendet. Es wurden Triplikate mit je 20 µl vermessen, wobei für jedes Target Mastermixe angefertigt wurden.

Tabelle 26: Reaktionsansatz qPCR

Reagenz	Volumen
2x SensiMix SYBR Low Rox	10 µl
Primer-Mix (2 µM)	2 µl
H ₂ O	6 µl
cDNA/ H ₂ O (H ₂ O-Kontrolle)	2 µl

Die Messung erfolgte auf 96-Well Platten am 7500 Fast Gerät der Firma Applied Biosystems. Folgendes Programm wurde verwendet.

Tabelle 27: Programm der qPCR

	Temperatur	Dauer	
	50°C	20 sec	
Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	
Annealing/Elongation	58,5°C	60 sec	40 Zyklen
Schmelzkurve	95°C	45 sec	
	60°C(+1%)-95°C	60 sec	
	95°C	30 sec	

3.2.2.3.1 Statistische Auswertung biologischer Triplikate

Die Auswertung der biologischen Triplikate der mittels quantitativer Real Time PCR ermittelten Daten erfolgte durch eine Metaanalyse. Bei den hier exemplarischen Rechnungen handelt es sich um die Berechnung einer zu untersuchenden Probe in Bezug auf die zugehörige Kontrolle, am Beispiel der *PANDAR* RNA und der Referenz-RNA *GAPDH*.

Die erhaltenen Cycle Threshold (CT) Werte der Proben wurden für die Berechnung der ΔCT -Werte verwendet (Formel 2). Nach der Berechnung des $\Delta\Delta CT$ eines jeden Experiments (Formel 3) unter Berücksichtigung der Standardfehler ΔCT_SE (Formel 4) wurden die Daten der biologischen Triplikate zusammengeführt (Formel 5) und die relative Quantität (Rq) berechnet (Formel 6). Nach dem Ermitteln der beidseitigen Konfidenzintervalle (KI) mit $\alpha=0,05$ (Formel 7), wurden die Werte für Rq_{\max} und Rq_{\min} berechnet (Formel 8). Nachfolgend wurde der Signifikanzwert (p-Wert) berechnet (Formel 9, Formel 10).

Formel 2: Berechnung des ΔCT -Wertes

$$\Delta CT_{\text{mean}} = CT_{\text{mean PANDAR}} - CT_{\text{mean GAPDH}}$$

Formel 3: Berechnung des $\Delta\Delta CT$ -Wertes

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{mean Probe}} - \Delta CT_{\text{mean Kontrolle}}$$

Formel 4: Berechnung der kombinierten Standardfehler

$$\text{weight} = \frac{1}{\Delta CT_SE_{\text{Probe}}^2 + \Delta CT_SE_{\text{Kontrolle}}^2}$$

Formel 5: Berechnung des biologischen Triplikats $\Delta\Delta CT$

$$\Delta\Delta CT_{\text{Triplikat}} = \frac{(\Delta\Delta CT_1 \cdot \text{weight}_1 + \Delta\Delta CT_2 \cdot \text{weight}_2 + \Delta\Delta CT_3 \cdot \text{weight}_3)}{(\text{weight}_1 + \text{weight}_2 + \text{weight}_3)}$$

Formel 6: Berechnung der relativen Quantität (Rq)

$$Rq = 2^{-(\Delta\Delta CT_{\text{Triplikat}})}$$

Formel 7: Berechnung des beidseitigen Konfidenzintervalls

$$KI_{\max/\min} = \begin{cases} KI_{\max} = \Delta\Delta CT_{\text{Triplikat}} + \frac{1 \cdot 1}{\sqrt{(\text{weight}_1 + \text{weight}_2 + \text{weight}_3)}} \cdot q_{\text{norm}}\left(1 - \frac{\alpha}{2}\right) \\ KI_{\min} = \Delta\Delta CT_{\text{Triplikat}} + \frac{(-1) \cdot 1}{\sqrt{(\text{weight}_1 + \text{weight}_2 + \text{weight}_3)}} \cdot q_{\text{norm}}\left(1 - \frac{\alpha}{2}\right) \end{cases}$$

Formel 8: Berechnung der relativen Konfidenzintervalle

$$Rq_{\max/\min} \begin{cases} Rq_{\max} = 2^{-(KI_{\max})} \\ Rq_{\min} = 2^{-(KI_{\min})} \end{cases}$$

Formel 9: Berechnung des p-Wertes (einseitig)

$$p\text{-Wert}_{\text{einseitig}} = 1 - \text{pnorm} \frac{(\Delta\Delta CT_1 \cdot \text{weight}_1 + \Delta\Delta CT_2 \cdot \text{weight}_2 + \Delta\Delta CT_3 \cdot \text{weight}_3)}{\sqrt{(\text{weight}_1 + \text{weight}_2 + \text{weight}_3)}}$$

Formel 10: Berechnung des p-Wertes (zweiseitig)

$$p\text{-Wert}_{\text{zweiseitig}} = 2 \cdot \min(p\text{-Wert}_{\text{einseitig}}, 1 - p\text{-Wert}_{\text{einseitig}})$$

3.2.2.4 *In vitro* Transkription

Zur Herstellung von *in vitro* transkribierter RNA wurde das zu transkribierenden DNA Templat mit einem davor befindlichen *T7*-Promotor mittels PCR hergestellt. Hierbei war der *T7*-Promotor über den Primer kodiert. Das DNA-Templat wurde im Anschluss mit Hilfe der *T7*-RNA Polymerase in RNA transkribiert. Die hier verwendete *T7*-RNA Polymerase wurde laborintern hergestellt.

Tabelle 28: Reaktionsansatz *in vitro* Transkription

Reagenz	Volumen/ Menge
DNA Templat	1000 ng
10xTranskriptionspuffer	7 µl
NTPs (25 nM)	3 µl
PPase (0,1 U/µl)	0,2 µl
<i>T7</i> RNA Polymerase (2 mg/ml)	1-2 µl
H ₂ O	ad 70 µl

Der oben beschriebene Ansatz wurde für 1,5 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss mit 1,5 µl RNase-freie DNase versetzt und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der *in vitro* hergestellten RNA erfolgte mittels Trizol Purification Kit der Firma ZymoResearch nach Herstellerangaben. Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop bestimmt und die RNA mittels Agarosegelen mit nachfolgender Ethidiumbromid-Färbung, hinsichtlich der Integrität, überprüft.

3.2.2.5 *In vitro* Transkription von Biotin-RNA

Für die Biotin-RNA wurde das T7 Polymerase Kit der Firma Thermo Scientific und der Biotin RNA labeling Mix (mit Biotin-16-UTP) der Firma Roche nach folgendem Schema verwendet.

Tabelle 29: Reaktionsansatz *in vitro* Transkription (Biotin-RNA)

Reagenz	Volumen/ Menge
DNA Templat	1500 ng
5xTranskriptionspuffer	4 µl
10x Biotin RNA Labeling Mix (NTPs)	2 µl
PPase (0,1 U/µl)	0,2 µl
T7 RNA Polymerase	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend erfolgte die Zugabe 1,5 µl RNase-freier DNase und eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Die Aufreinigung erfolgte mittels RNA Clean and Concentrator-5 Kit der Firma ZymoResearch nach Herstellerangaben. Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop bestimmt und die RNA mittels Agarosegelen mit nachfolgender Ethidiumbromid-Färbung, hinsichtlich der Integrität, überprüft.

3.2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde verwendet um DNA zu amplifizieren. Die amplifizierte DNA wurde im Anschluss für Klonierungszwecke oder auch als Templat für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Als Templat dienten cDNA oder auch bereits klonierte Plasmide. Die PfuCx Polymerase wurde laborintern hergestellt. Die Zusammensetzung eines 50 µl Ansatzes ist hier aufgeführt:

Tabelle 30: Reaktionsansatz PCR

Reagenz	Volumen/ Menge
5x PfuCx Puffer	10 µl
5'-Primer (10 µM)	1,0 µl
3'-Primer (10 µM)	1,0 µl
Templat	100 ng
dNTPs (25 nM)	0,5 µl
PfuCx Polymerase	1,0 µl
H ₂ O	auf 50 µl

Jede PCR wurde gemäß der spezifischen Annealingtemperatur des Primerpaares, sowie die Länge der Elongationszeit, der zu amplifizierenden DNA, angepasst. Wobei die Annealingtemperatur zu Beginn mittels Gradienten-PCR analysiert wurde. Hierfür wurde der 50 µl Ansatz in 5x 10 µl Ansätze aufgeteilt und bei 5 variierenden Temperaturen (53-63°C) mittels PCR amplifiziert. Ein exemplarisches PCR-Programm ist hier aufgeführt:

Tabelle 31: Programm PCR

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95°C	45 sec	30 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing	56°C	20 sec	
Elongation	72°C	45 sec	
Elongation	72°C	5 min	
	4°C	Pause	

Die PCR-amplifizierten Template wurden mittels Agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt, analysiert und anschließend aufgereinigt. Die Aufreinigung der Gelstücke erfolgte durch das Gel-Extraktionskit der Firma Omega Bio-Tek nach Herstellerangaben.

3.2.2.7 Kolonie-PCR

Zur ersten Überprüfung eines Klonierungserfolgs wurde eine Kolonie-PCR mit den, nach der Transformation, gewachsenen Bakterienklonen durchgeführt. Hierfür wurden Primer verwendet die vor und nach der Integrationsstelle des Inserts im Plasmid ansetzten und somit das Überprüfen der richtigen Länge und Lokalisation des Insert ermöglichen. Der Klon wurde mit einer Spitze in die einen 10 µl Kolonie-Ansatz (Tabelle 32) gemischt und für eine spätere Präparation des Plasmids zusätzlich auf einer entsprechenden Antibiotika-haltigen Platte übertragen.

Tabelle 32: Reaktionsansatz Kolonie-PCR

Reagenz	Volumen
2x My Taq Mix (Bioline)	5 µl
5'-Primer (10 µM)	1 µl
3'-Primer (10 µM)	1 µl
H ₂ O	3 µl

Der Kolonie-PCR erfolgte bei folgendem PCR Programm, wobei die Elongationszeit in Abhängigkeit von der Länge des zu untersuchenden Inserts angepasst wurde.

Tabelle 33: Programm Kolonie-PCR

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95°C	45 sec	
Denaturierung	95°C	30 sec	30 Zyklen
Annealing	56°C	20 sec	
Elongation	72°C	45 sec	
Elongation	72°C	5 min	
	4°C	Pause	

Die Analyse der Kolonie-PCR erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

3.2.2.8 Agarose-Gele und Extraktion der DNA-Fragmente

Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurde ein Agarosegel mit TAE-Puffer hergestellt, wobei die Prozentigkeit des Gels der erwarteten Größe der Produkte angepasst wurde. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels aufgetragen, ein zusätzlicher DNA-Marker diente als Größenorientierung. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte in der mit TAE-Puffer gefüllten Kammer der Firma Biorad (kleines Gel: 30 min 100 V; großes Gel: 40 min 150 V). Das Agarosegel wurde in einem Ethidiumbromid-Färbebad für 30-40 min angefärbt und die DNA-Fragmente unter UV-Licht analysiert. Die DNA-Fragmente mit erwarteter Größe wurden mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel geschnitten und mittels Gelextraktionskit der Firma Omega Bio-Tek, nach Herstellerangaben, aufgereinigt.

3.2.2.9 Klonierung

Für das Einbringen von Genen in Plasmide wurden, je nach Experiment, drei verschiedene Klonierungsstrategien verwendet.

3.2.2.9.1 Gateway

Für die Gateway-basierte Klonierung wurden die Reagenzien der Firma Invitrogen verwendet. Das verwendete Protokoll basiert auf Herstellerangaben wurde jedoch modifiziert. Hierfür wurde das Templat aus cDNA mit Gateway-spezifischen Rekombinationsstellen (attB sites) mittels PCR generiert, Agarosegel-aufgereinigt und Gel-eluiert (30 µl). Das Einbringen des Templates, im Austausch gegen das *ccdB*-Gen, in das entry Plasmid pDONR201 erfolgte mittels BP-Reaktion. Hierfür wurden 2,3 µl des geleluierten Templates mit 45 ng pDONR201 Plasmid und 0,6 µl BP-Clonase für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und ein Proteinase K

Verdau (0,3 µl) für 10 min bei 37°C durchgeführt. Im Anschluss wurden 2 µl in chemisch kompetente Zellen transformiert, auf Kanamycin-haltige Agarplatten ausplattiert, Klone gepickt, expandiert und das Plasmid isoliert. Das sequenzierte Plasmid wurde im weiteren Verlauf für die LR-Reaktion eingesetzt, um das Templat in das Zielplasmid zu integrieren. Hierfür wurde 75 ng des hergestellten entry clones mit 75 ng Zielplasmid und 0,5 µl LR-Clonase Mix auf 3 µl mit TE-Puffer aufgefüllt, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und ein Proteinase K Verdau (0,3 µl) für 10 min bei 37°C durchgeführt. Im Anschluss wurden 2 µl in chemisch kompetente Zellen transformiert und auf Antibiotika-haltige Agarplatten (je nach Plasmid) ausplattiert, Klone gepickt, expandiert, Plasmid isoliert und sequenziert.

3.2.2.9.2 Restriktion-Ligation

Für die Klonierungsstrategie der Restriktion-Ligation-Methode wurde das Templat mittels PCR mit den spezifischen Restriktionsschnittstellen generiert. Templat und Zielplasmid wurden mit den gewünschten Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben (NEB) geschnitten, die Enzyme inaktiviert und das Plasmid dephosphoryliert (Antarktische Phosphatase). Das geschnittene Templat und Plasmid wurde gelelektrophoretisch analysiert und die spezifischen Banden aus dem Agarosegel eluiert. Die Ligation mittels T4-DNA Ligase (NEB) im molaren Verhältnis von 1:3 (Plasmid:Insert) erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur nach Herstellerangaben. Im Anschluss wurden 2 µl in chemisch kompetente Zellen transformiert und auf Antibiotika-haltige Agarplatten (je nach Plasmid) ausplattiert, Klone gepickt, expandiert, Plasmid isoliert und sequenziert.

3.2.2.9.3 Sequence independent ligation cloning (SLIC)

Für die Methode des Sequence independent ligation clonings (SLIC) basiert auf der Exonucleaseaktivität der T4-DNA Polymerase, wodurch einzelsträngige DNA Überhänge in Plasmid und Insert generiert werden, welche kompatible zueinander sind. Hierfür wurde das SLIC-kompatible Insert mittels PCR generiert, wobei die Templat-spezifischen Primer zusätzliche 20 bp des Zielplasids kodierten. Das Gel-aufgereinigte Insert und das mit Restriktionsenzym-geschnittene und aufgereinigte Plasmid wurden jeweils im 70 µl Ansatz mit NEB2 Puffer und 0,5 Units T4-DNA Polymerase für 30 min bei 22°C behandelt. Die Reaktion wurde mit 1/10 Volumen dCTP (Stock: 10 mM) abgestoppt. Das Annealing des Inserts mit dem Plasmid erfolgte im 1x Ligase Puffer für 30 min bei 37°C, wobei das Verhältnis von Insert zu Plasmid größenabhängig war. Im Anschluss wurden 2 µl in chemisch

kompetente Zellen transformiert und auf Antibiotika-haltige Agarplatten (je nach Plasmid) ausplattiert, Klone gepickt, expandiert, Plasmid isoliert und sequenziert.

3.2.2.10 Transformation und Präparation des Plasmids

Für das Einbringen von Plasmiden in Bakterienzellen wurde die Methode der chemischen oder elektrischen Transformation mit entsprechenden kompetenten *E.coli* Zellen verwendet.

Für die chemische Transformation wurden die kompetenten Zellen (100 µl Aliquot) zuvor aufgetaut und mit 100-150 ng Plasmid auf Eis für 30 min inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42°C für 45 sec, sowie eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und bei 600 rpm für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde bei 5000 rpm für 1 min zentrifugiert, 500 µl des Überstandes wurden verworfen, das Pellet im restlichen Überstand resuspendiert und auf einer entsprechenden Antibiotika-haltigen Platte ausplattiert. Die Inkubation der Platte erfolgte bei 37°C über Nacht im Inkubator.

Für die Transformation mittels Elektroporation wurden die elektrisch-kompetenten Zellen (50 µl Aliquot) aufgetaut, mit 100 ng Plasmid versetzt und in eine Elektroporationsküvette (0,1 cm Spaltbreite) überführt. Mittels Elektroporators (Eppendorf 2510) wurde eine Spannung von 1800 V angelegt und das Plasmid in die Bakterienzelle eingebracht. Es wurde 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium in die Küvette gegeben und die Bakteriensuspension in ein neues Eppli überführt. Die Regeneration der Zellen erfolgt für 45 min bei 600 rpm und 37°C. Nachfolgend wurden die Zellen bei 5000 rpm für 1 min abzentrifugiert, 450 µl des Überstands verworfen und das Pellet im restlichen Überstand resuspendiert. Die Suspension wurde auf einer entsprechenden Antibiotika-haltigen Platte ausplattiert. Die Inkubation der Platte erfolgte bei 37°C über Nacht im Inkubator.

Für die Vervielfältigung des Plasmids für die nachfolgende Überprüfung und Verwendung für Experimente wurden einzelne Klone mit Hilfe einer sterilisierten Pipettenspitze gepickt und jeweils in ein sterilisiertes Reagenzglas mit 5 ml LB Medium und dem entsprechenden Antibiotikum gegeben. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C und 170 rpm konnte das Plasmid mit Hilfe des E.N.Z.A Plasmid Mini Kits der Firma Omega Biotech, nach Herstellerangaben, aufgereinigt werden.

3.2.2.11 Sequenzierung

Zur Validierung des Inserts und des Klonierungserfolges wurde die Sequenzierungsmethode nach Sanger verwendet, welche intern am Max Planck Institut Dortmund durchgeführt wurde. Der Probenansatz zur Vorbereitung der Sequenzierung sah wie folgt aus:

Tabelle 34: Reaktionsansatz Sequenzierung

Reagenz	Volumen/Menge
10x Terminatormix	2 µl
Primer (10 µM)	1 µl
Templat	200-350 ng
H ₂ O	auf 20 µl

Die Amplifizierung des Sequenzierungs-Ansatzes erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

Tabelle 35: Programm der Sequenzierung

Temperatur	Dauer	
96°C	30 sec	26 Zyklen
95°C	30 sec	
50°C	15 sec	
60°C	4 min	
4°C	Pause	

Die Proben wurden anschließend für die Präzipitation in ein 0,5 ml Eppi überführt und mit 50 µl 100% Ethanol, 2 µl 3 M NaAc und 2 µl 125 mM EDTA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation (15 min, 13000 rcf, Raumtemperatur) wurde der Überstand abgenommen, mit 70 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min, 13000 rcf, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abgenommen und die Proben bei Raumtemperatur mit geöffnetem Deckel getrocknet.

3.2.2.12 SDS Gele

Die zu analysierenden Proteinproben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, verwendet wurde das System von Bio-Rad. Die Prozentigkeit der Gele wurde der erwartenden Größe des zu analysierenden Proteins angepasst. Die Denaturierung und Angleichung der Ladungsdichte der Proteinproben erfolgte durch das Hinzufügen von SDS-Probenpuffer und Erhitzen für 5 min bei 95°C im Heizblock. Die denaturierten Proteinproben wurden neben einem Proteinmarker, als Größenstandard, in die Taschen des SDS-Gels beladen. Die Auftrennung erfolgte im 1xSDS Laufpuffer bei 150 V. Im Falle von Tricin-

Gelen wurde Kathoden und Anodenpuffer verwendet. Die anschließende Detektion der Proteine erfolgte durch Coomassie-Färbung oder mit Antikörpern nach dem Blotten auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran.

3.2.2.12.1 Coomassie-Färbung

Zur Detektion der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde mit Coomassie angefärbt. Hierfür wurde das SDS-Gel für 1 h in Coomassie-Färbelösung angefärbt und im Anschluss mit Entfärberlösung entfärbt.

3.2.2.12.2 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss mittels Semi-Dry Methode (Biorad) auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran geblottet. Im Falle der PVDF-Membran wurde diese zuvor 5 min in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer, wie auch Whatman-Papier und SDS-Gel, äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte von der Anode zur Kathode in folgender Reihenfolge: 2 Schichten Whatman-Papier, 1x Membran, 1x SDS-Gel und 2 Schichten Whatman-Papier. Die Übertragung der Proteine auf die Membran für 1 bzw. 2 Blots erfolgte für 30 bzw. 60 min bei 180 mA. Nach der Übertragung der Proteine auf die Membran wurde diese für 1 h bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver (in 1xTBS-T) blockiert und über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Erstantikörper in 5% Milchpulver (in 1xTBS-T) inkubiert. Nachfolgend wurde der Erstantikörper entfernt, 3x 5 min mit 1xTBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden Alkalischer Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörper (in 5% Milchpulver in 1xTBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 1xTBS-T für je 10 min konnte mit BCI/NBT Substrat (Sigma Aldrich) entwickelt werden.

3.2.3 Peptide Nucleic Acids

3.2.3.1 PNA Design und Synthese

Die Peptide Nucleic Acids (PNA) wurden mit einer Länge von 15 Basenpaaren spezifisch gegen die lange nicht-kodierende RNA *PANDAR* (NR_109836.1) designt, PNA1 (C-TTGGAGCTGGAGTCA-N), PNA2 (C-AAGTCCTTACGGCGT-N), PNA3 (C-CGTCTGTGTTACCGA-N). Die Synthese erfolgte mittels Festphasen-Synthese mit einem NovaSynTGR Harz (Beladung 0,025 mmol/g) in einer 2 ml Spritze mit Fritte, die einzelnen Schritte erfolgten unter konstantem Schütteln bei 240 rpm. Die PNA Bausteine (Fmoc-G(Bhoc)-aeg-OH, Fmoc-C(Bhoc)-aeg-OH, Fmoc-A(Bhoc)-aeg-OH, Fmoc-T-aeg-OH) wurden von der Firma Link Technologies verwendet (Abbildung 36). Die Ansatzgröße der Synthese betrug 20 mmol.

Eine schematische Übersicht des Arbeitsablaufes der PNA-Synthese ist in der Abbildung 9 dargestellt und wird nachfolgend beschrieben. Nach dem Quellen des Harzes für 1 h in NMP und waschen (3x NMP, 3x DCM, 3x NMP) erfolgte die Kupplung des ersten Bausteins für 4 h (4 eq PNA Baustein, 4 eq PyBOP, 8 eq NMM in NMP). Nach dem Waschen (3x NMP, 3x DCM, 3x NMP) wurden die nichtreagierten Aminogruppen des Harzes für 5 min mit Pyridin+ Ac₂O (10:1) gecappt. Nach einem weiteren Waschzyklus (3x NMP, 3x DCM, 3x NMP, 1x DMF) erfolgte die Entschützung der temporären Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) Schutzgruppe mit 20% Piperidin in DMF (2x 2 min). Zu diesem Zeitpunkt konnte mittels Fmoc Monitoring die Beladung bestimmt werden. Nach einem erneuten Waschzyklus (3x NMP, 3x DCM, 3x NMP) erfolgte die Kupplung des zweiten PNA-Bausteins. Zur Steigerung der Kupplungseffizienz mit wachsender Länge wurden Doppelkupplungen pro PNA-Baustein durchgeführt. Die erste Kupplung erfolgte für 2 h mit 3 eq PNA Baustein, 3 eq PyBop, 6 eq NMM in NMP, gefolgt von dem zweiten Kupplungsschritt für 45 min mit 1 eq PNA-Baustein, 1 eq COMU, 1 eq Oxyma, 2 eq DIPEA in NMP. Die Kupplungserfolge wurden nach je 5 Bausteinen vor dem Fmoc-Entschützen mittels Testabspaltung vom Harz überprüft. Hierfür wurde zuvor gecappt, das Harz gewaschen und getrocknet. Eine Spatelspitze Harz wurde aus der Spritze in ein neues Tube überführt und mit 200 µl Abspaltlösung (188 µl TFA, 5 µl H₂O, 5 µl ODT, 2 µl TIPS) für 3 h bei 240 rpm inkubiert. Durch die Behandlung mit TFA wird die Benzhydryloxycarbonyl-(Bhoc) Schutzgruppe entfernt. Nach der Fällung mit eiskaltem Ether bei -20°C wurde für 3 min bei 4°C mit 3000 rcf zentrifugiert, der Überstand im Anschluss verworfen und das Pellet getrocknet. Die Analyse des Kupplungserfolgs erfolgte durch die Injektion der Probe an der HPLC-MS C18-Säule (reverse-phase C18 der Firma Agilent, Partikelgröße: 5 µm, Säule: 4,6 x 150 mm) und Acetonitril (ACN) Gradienten.

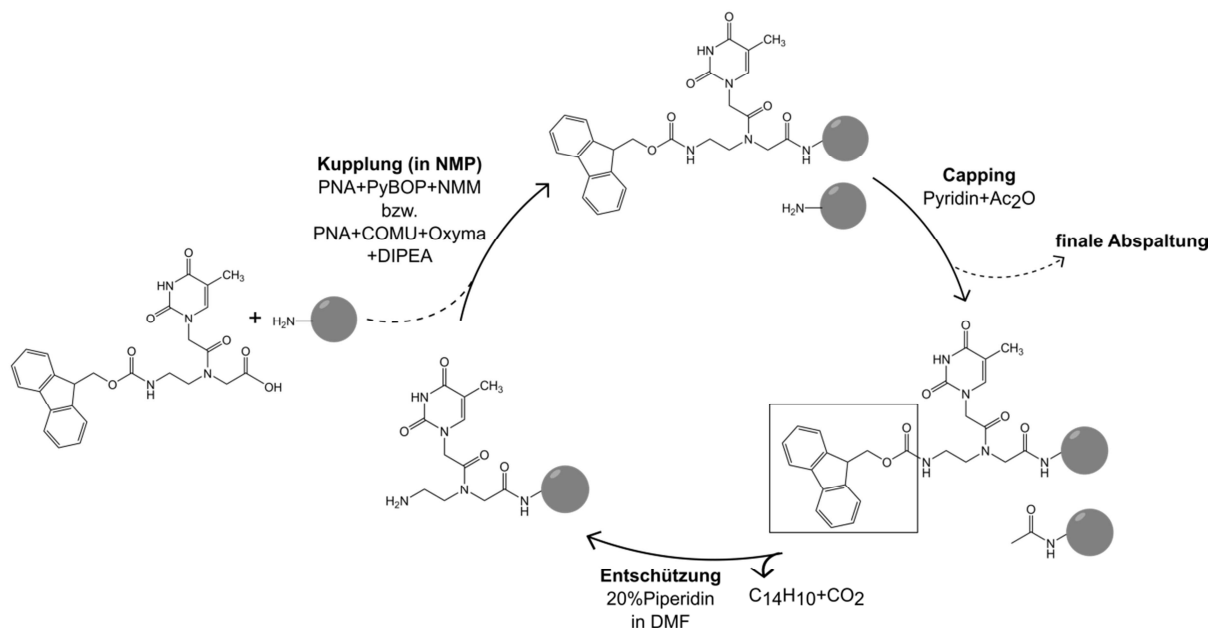


Abbildung 9: Schematischer Arbeitsablauf der PNA Synthese

Die Festphasen PNA Synthese erfolgt an einem NovaSyn-TGR Harz. Nach initialem Quellen des Harzes erfolgt die erste Kupplung des PNA-Bausteins (hier dargestellt: Fmoc-T-aeg-OH) an Aminogruppe des Harzes. Im Anschluss werden die nicht reaktierten Aminogruppen gecappt, sodass diese für die weitere Synthese reaktionsunfähig sind. Für die Vorbereitung des nächsten Kupplungsschritts, wird die temporäre Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (Entschützung). Die nun freie Aminogruppe dient als Angriffspunkt für die Kupplung des nächsten Bausteins. Nach der Synthese bis zur finalen PNA-Länge und ggf. hinzufügen von Modifikationen wird die PNA vom Harz abgespalten und aufgereinigt.

Die PNA wurde mit einem PEG-Linker gekoppelt und je nach Verwendungszweck wurde Biotin oder Fluorescein (FITC) hinzugefügt. Die Kupplung von PEG, Biotin und FITC erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die der PNA-Bausteine, wobei im Anschluss an Biotin und FITC Kupplung kein Capping und keine Fmoc-Entschützung folgte. Die fertige PNA wurde 3x mit DCM gewaschen und am Vakuum getrocknet. Nach erfolgreicher Synthese erfolgte die Vollabspaltung vom Harz mit 1662,5 µl TFA, 43,75 µl H₂O, 43,75 µl ODT, 17,5 µl TIPS für 3 h bei 240 rpm, Präzipitation mit kaltem Ether für 20 min (-20°C) und Zentrifugation für 3 min bei 3000 rcf (4°C). Nach einem erneuten Waschschritt mit kaltem Ether, Zentrifugation und Trocknen des Pellets mit Druckluft wurde die PNA in 10% ACN aufgenommen, mittels präparativer HPLC (C6-Säule) und ACN Gradienten aufgereinigt und die PNA enthaltenen Fraktionen mittels HPLC-MS mit ACN Gradient analysiert. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

Tabelle 36: hergestellte gegen *PANDAR* RNA gerichtete PNAs

PNA	Linker	Label
PNA1	PEG5	FITC
PNA2	PEG1	FITC
PNA3	PEG5	FITC
PNA1	PEG5	Biotin
PNA2 (synthetisiert von Philine Hagel)	PEG5	Biotin
PNA3	PEG5	Biotin

3.2.3.2 PNA-RNA FP Assay

Zur Überprüfung der Bindung von gegen *PANDAR* gerichteten PNAs an *PANDAR* RNA wurde ein Fluoreszenz Polarisations Assay durchgeführt. Hierfür wurde FITC-PNA verwendet und gegen *in vitro* transkribierte *PANDAR* Vollängen RNA titriert. Verwendet wurden 384 Platten (Corning). Die FITC gelabelte PNA (10 µM stock in DMSO) wurde auf eine finale Konzentration von 40 nM in FP Puffer (10 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,1% Tween 20) gebracht. In jedes Well wurden jeweils 15 µl FP-Puffer vorgelegt (Triplikat-Messung/PNA) und zum Titrieren der RNA in das jeweils erste Well 10 µl RNA hinzugefügt. Ausgehend von dieser Wellreihe wurde mit Hilfe einer Multikanal-Pipette 10 µl in das nächste Well überführt. Im Anschluss wurden je 5 µl des 40 nM FITC-PNA Stocks hinzugefügt, sodass die Endkonzentration bei 10 nM lag. Die Messung erfolgte am Safire2 (Exzitation: 470 nm, Emission: 525 nm).

3.2.3.3 PNA Pull Down mit isolierter RNA

Zur Überprüfung der Bindung von PNA an *PANDAR*-RNA aus isolierter Gesamt-RNA (*PANDAR*-U2OS Zellen) wurde ein Pull Down durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde mittels Phenol-Chloroform Extraktion aus *PANDAR*-überexprimierenden U2OS Zellen gewonnen. Der verwendete Puffer (10 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl und 0,5 mM EDTA) wurde zum Verdünnen und Waschen verwendet. Als Input-Probe wurden 500 ng Gesamt-RNA verwendet. Für den Pull Down wurden 50 pmol biotinylierte *PANDAR*-PNA (PNA1, 2, 3) mit 5 µg totaler RNA für 3 h bei 4°C in einem Gesamtvolumen von 200 µl am Drehrad inkubiert. Der Kontrollansatz enthielt H₂O anstelle von PNA. Im Anschluss wurden pro Ansatz 25 µl in Puffer gewaschene Streptavidin Beads hinzugefügt und für eine weitere Stunde am Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach der magnetischen Separation wurde die Beads 3x mit 400 µl Puffer gewaschen, die Beads in 10 µl H₂O aufgenommen, bei 60°C für 5 min erhitzt und 6 µl für die

cDNA Synthese eingesetzt. Im Anschluss folgte die Analyse der gebundenen *PANDAR* RNA Menge mittels quantitativer Real Time PCR.

3.2.4 Quantitative massenspektrometrische Analyse des PNA-basierten Pull Downs

Zur Untersuchung von *PANDAR*-bindenden Kandidaten wurden wildtypische U2OS Zellen in SILAC Medium mit Arg0/Lys0 und Arg10/Lys8 für fünf Passagen kultiviert. Nach der positiven Validierung der Inkorporationseffizienz der Aminosäuren in die Proteine, wurden die Zelllysate mit *in vitro* transkribierter *PANDAR* Vollängen RNA gespiked und ein Pull Down mit biotinylierter PNA1 und PNA3 durchgeführt. Hierfür wurden pro Ansatz 50 µl Streptavidin magnetischen Beads (NEB) mit 300 µl Puffer mittels magnetischer Separation gewaschen und im ursprünglichen Volumen aufgenommen. Für alle Wasch- und Verdünnungsschritte wurde Puffer (10 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA und Protease-Inhibitor) verwendet. Die Ansätze für die jeweiligen PNAs bzw. Kontrolle wurden erst vor der Zugabe der Zelllysate gesplittet. Pro 50 µl Beads wurden 50 pmol biotinylierter PNA (in H₂O) in 210 µl Endvolumen für 1 h bei 4°C am Drehrad gekoppelt. Als Kontrolle wurde anstelle von PNA H₂O hinzugefügt. Die Beads wurden magnetisch separiert, die ungebundenen PNAs im Überstand entfernt und 100 pmol (pro 50 µl Beads) *in vitro* transkribierte *PANDAR* RNA mit dem PNA-Bead Gemisch in 300 µl Endvolumen für 1,5 h bei 4°C am Drehrad inkubiert. Für die Kontrolle wurde H₂O anstelle von RNA hinzugefügt. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen, die Beads gewaschen und in je 2 Ansätze aufgeteilt. Die Zellpellets der in SILAC Medium kultivierten Zellen wurden mit RIPA Puffer für 30 min auf Eis lysiert und im Anschluss bei 15000 rcf für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde daraufhin zu dem jeweiligen Bead-PNA-RNA Komplex gegeben und für 1,5 h am Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben magnetisch separiert und 3x gewaschen (ohne Detergenzien). Die Proben wurden daraufhin folgendermaßen in ein neues Eppli überführt, kombiniert und ein weiteres Mal zusammen gewaschen:

Tabelle 37: Kombination der SILAC-Proben

	Arg0/Lys0	Arg10/Lys8
Biotin-PNA1	+ spiked <i>PANDAR</i>	- spiked <i>PANDAR</i>
Biotin-PNA1	- spiked <i>PANDAR</i>	+ spiked <i>PANDAR</i>
Biotin-PNA3	+ spiked <i>PANDAR</i>	- spiked <i>PANDAR</i>
Biotin-PNA3	- spiked <i>PANDAR</i>	+ spiked <i>PANDAR</i>

Im Anschluss wurde ein tryptischer Verdau der Proben und quantitative MS durchgeführt. Der tryptische Verdau wurde unter Schütteln (1000 rpm bei RT) mit den Beads durchgeführt. Hierfür wurden 50 µl 8 M Urea und 1 mM DTT für 30 min inkubiert. Gefolgt von 5,5 mM Iodacetamid (IAA) für 20 min lichtgeschützt und für 1 h mit 0,5 mg Lysyl Endopeptidase. Die Lösung wurde magnetisch separiert und der Überstand in ein neues Eppi überführt. Die Beads wurden mit 50 µl 20 mM Ammoniumbicarbonat (ABC) und 1 µl Trypsin für 1 h inkubiert und der Überstand nach der magnetischen Separierung mit dem ersten kombiniert, um anschließend mit 100 µl 20 mM ABC und 1 µl Trypsin über Nacht bei Raumtemperatur behandelt zu werden. Am nächsten Tag wurde die Reaktion mit einer finalen Konzentration von 0,15% TFA abgestoppt und der C18 stagetip wurde durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte durch Dr. Tanja Bange (AG Mussacchio, MPI Dortmund)

3.2.4.1 Validierung der SILAC Kandidaten mittels GFP-Pull Down

Für die weitere Validierung der *PANDAR*-bindenden Protein-Kandidaten wurden die Gene aus cDNA gewonnen und mittels Gateway-System in das pcDNA3.1 Plasmid kloniert. Für einige Kandidaten (CELF, MBNL1, HTRA2) wurden bereits fertige eGFP-getaggte Plasmide von Addgene verwendet. Pro 6-Well wurden 400000 *PANDAR*-U2OS Zellen ausplattiert und am darauffolgenden Tag für 24 h transient transfiziert, als Kontrolle diente ein pcDNA3.1 eGFP-Leerplasmid. Nach Überprüfung einer effizienten Transfektion anhand des GFP-Signals am Mikroskop, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit je 120 µl RIPA Puffer (mit Protease Inhibitor) mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Die Zellsuspension wurde für 30 min auf Eis lysiert, mit 100 µl Puffer versetzt und mit einer Spritze mit Kanüle behandelt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 15000 rcf bei 4°C, wurde der lösliche Überstand in ein neues Eppi überführt und mit weiteren 80 µl Puffer versetzt. Der verwendete Puffer (10 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl und 0,5 mM EDTA) wurde zum Verdünnen und Waschen verwendet. Das Pellet wurde in 30 µl 1xSDS Proben Puffer aufgenommen und für den Western Blot verwendet. Aus dem Überstand wurde im Anschluss die Input Probe für Protein (10 µl+ 3 µl 5x SDS Proben-Puffer) und RNA (25 µl+ 200 µl TRIsure) gewonnen. Die GFP-Trap magnetischen Agarose Beads (Chromotek) wurden mit Puffer gewaschen und im ursprünglichen Volumen in Puffer aufgenommen, sodass für jede Probe 12,5 µl Beads verwendet wurden. Die äquilibrierten Beads wurden zu den jeweiligen Überständen hinzugefügt und für 2 h am Drehrad bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Beads am magnetischen Rack separiert und 50 µl des nichtgebundenen Überstandes (+ 10 µl 2x SDS-

Proben-Puffer) für die Protein-Probe verwendet. Nach dreimaligen Waschen mit 400 µl Puffer wurden die Beads in 100 µl Puffer aufgenommen und in 2x50 µl Proben gesplittet. Ein Anteil wurde mit 200 µl TRIsure versetzt und für die RNA Isolierung mittels Phenol-Chloroform Methode verwendet. Der andere Anteil wurde erneut, nach Hinzufügen von 250 µl Puffer, magnetisch separiert und die Beads mit 30 µl 1x SDS Proben-Puffer versetzt. Die Protein-Proben wurden für den Western Blot mit GFP-Antikörper verwendet, die RNA für cDNA Synthese und Real Time PCR hinsichtlich der gebundenen *PANDAR* RNA Menge analysiert.

3.2.4.1.1 statistische Analyse des Z-Scores

Für die statistische Auswertung der Daten wurde die gebundene *PANDAR* RNA Menge der potenziellen Kandidaten auf die *PANDAR* RNA Menge der GFP-Kontrolle (=1) normiert. Als Schwellenwert für die weiter zu validierenden Kandidaten wurde der Standard-Score (Z-Score) ermittelt. Dieser beschreibt im Allgemeinen die Distanz eines ermittelten Wertes (x) in Bezug auf den Durchschnitt der Gesamtheit aller ermittelten Werte. In Rahmen dieser statistischen Auswertung wurden der Median (Formel 11) und die mittlere absolute Abweichung (MAD) verwendet (Formel 12), sodass der Z-Score nach Formel 13 berechnet wurde. Für die weitere Validierung wurde ein Z-Score von 3 als Schwellenwert gewählt.

Formel 11: Berechnung des Medians

$$\text{Median}(x) = \begin{cases} x_{\frac{n+1}{2}} & \text{Anzahl der Proben (n) ungerade} \\ \frac{1}{2} \left(x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1} \right) & \text{Anzahl der Proben (n) gerade} \end{cases}$$

Formel 12: Berechnung der mittleren absoluten Abweichung (MAD)

$$\text{MAD} = \text{Median}(|x_i - \text{Median}(x)|)$$

Formel 13: Berechnung des Z-Scores

$$\text{Z-Score} = \frac{x_i - \text{Median}(x)}{\text{MAD}}$$

3.2.4.2 Validierung der SILAC Kandidaten mittels Biotin-*PANDAR* RNA

Die Analyse der SILAC Kandidaten auf endogenem Protein Level in Zellen wurde mittels biotinylierter *PANDAR* RNA durchgeführt. Hierfür wurde die *PANDAR* RNA mittels *in vitro* Transkription unter Verwendung des T7-RNA Polymerase Kits (Thermo) und des RNA Labeling Mixes (mit Biotin-16-UTP) hergestellt. Für diesen Pull Down wurden 5 µg Biotin-*PANDAR* RNA auf 50 µl mit Strukturpuffer (10 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 7, 100 mM KCl) aufgefüllt, für 5 min auf 50°C aufgeheizt, 2 min auf Eis und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Verdünnen und Waschen der Proben wurde folgender Puffer verwendet 10 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl und 0,5 mM EDTA. Die Streptavidin magnetischen Beads wurden 2x in Puffer gewaschen, im ursprünglichen Volumen in Puffer aufgenommen, sodass für jeden Ansatz 30 µl verwendet wurden. Die *in vitro* transkribierte Biotin-*PANDAR* RNA wurde mit den Beads in einem Gesamtvolumen von 450 µl für 1,5 h bei 4°C am Drehrad inkubiert, für die Kontrolle wurde nur Strukturpuffer verwendet. Für das Lysat wurden wildtypische U2OS Zellen verwendet, welche mit PBS gewaschen wurden und mit 200 µl RIPA Puffer (mit Protease Inhibitor) und einem Zellschaber von der Platte gelöst wurden. Die Suspension wurde in ein Eppli überführt und für 30 min auf Eis lysiert. Nach dem Resuspendieren des Lysats mit einer Spritze und Kanüle wurde bei 15000 rcf für 10 min 4°C zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde in ein neues Eppli überführt, als Input Probe wurden 80 µl mit 20 µl 5xSDS-Puffer versetzt und das Pellet für die Western Blot Analyse in 50 µl 1xSDS Proben Puffer aufgenommen. Nach 3x Waschen der zuvor inkubierten Beads wurden 200 µl des Lysats zu den Beads gegeben und mit 200 µl Puffer auf ein Volumen von 400 µl gebracht. Nach der magnetische Separation der Beads, wurde vom nichtgebundene Überstand eine Protein-Probe genommen (450 µl Probe+ 50 µl 5x SDS Proben Puffer). Die Beads wurden 4x mit 400 µl Puffer gewaschen und in 100 µl 1x SDS Proben-Puffer aufgenommen. Die genommenen Protein-Proben wurden für die Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen die endogenen SILAC Protein-Kandidaten verwendet.

3.2.4.3 Co-Immunopräzipitation mittels GFP-Pull Down

Die wildtypischen U2OS Zellen wurden wie zuvor beschrieben (3.2.4.1), für 24 h transient mit eGFP-getaggten Plasmiden in wildtypische U2OS Zellen transfiziert und im Anschluss lysiert. Der Pull Down mit je 20 µl GFP-magnetischen Beads (Chromotek) und +/- 5 µl RNase A/T (Roche). Probenentnahme für Input, nicht gebundener Durchfluss und gebundene Fraktion.

3.2.4.4 Überprüfung des *BCL-XS* Transkripts

Für die Überprüfung, ob *PANDAR* das *BCL-XS* Transkript reguliert, wurden wildtypische U2OS Zellen ausplattiert und am darauffolgenden Tag mit Kontrollplasmid, *PANDAR*-Plasmid und eGFP-PTBP1-Plasmid mit Lipofectamin 2000 nach Herstellerangaben für 48 h transfiziert. Nachfolgend wurde die RNA isoliert, cDNA hergestellt und die Menge an *BCL-XS* mRNA im Vergleich zu *GAPDH* mittels qPCR analysiert.

3.2.5 NF-Y Expression und Aufreinigung

Zur Verwendung der NF-Y Proteinefragmente (NF-YA₂₃₃₋₃₀₃, NF-YB₅₁₋₁₄₃, NF-YC₂₇₋₁₂₀) in biochemischen Assays wurden diese Proteine in *E.coli* Zellen exprimiert und nachfolgend aufgereinigt. Die Klonierung des NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ Fragments erfolgte mittels Restriktion-Ligation in das pGex-6p2 Plasmid. Die Fragmente NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀ wurden gemeinsam, mittels Gateway und SLIC Klonierung, in das pACYC-Duet Plasmid kloniert. Die Etablierung der Expression und Aufreinigung von NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Stefan Grote unter meiner Betreuung. Die Etablierung der Expression und Aufreinigung von NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀ erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Philine Hagel unter meiner Betreuung.

Tabelle 38: Verwendete NF-Y Konstrukte

Konstrukt	Plasmid	Expressionsstamm	Tag und Protease-Schnittstelle
NF-YA ₂₃₃₋₃₀₃	pGex-6p2	BL21(DE3)RIL	GST-Tag+ Prescission
NF-YB ₅₁₋₁₄₃ NF-YC ₂₇₋₁₂₀	pACYC-Duet	BL21(DE3)	6xHis-Tag+ Prescission (vor NF-YB)

3.2.5.1 Expression und Zellaufschluss

Die Transformation des pGex-6p2-NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ bzw. pACYC-Duet-NF-Y₅₁₋₁₄₃-NF-YC₂₇₋₁₂₀ erfolgte in chemisch kompetente BL21(DE3)RIL bzw. BL21(DE3) *E.coli* Zellen mit anschließender Inkubation der Suspension auf den jeweiligen Antibiotika-haltigen Agarplatten üN bei 37°C.

Für die Vorkultur wurden die Klone der Platte in 120 ml LB-Medium überführt und bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Für die Hauptkultur wurde 5 l TB-Medium verwendet, auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 inkubiert. Die Proteinexpression erfolgte durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG und anschließender Inkubation bei 25°C und 150 rpm üN. Die Bakteriensuspension wurde im Anschluss mittels Ultrazentrifuge der Firma Beckmann für 20 min bei 4°C und 5000 rpm pelletiert. Das

entstandene Pellet wurde im 50 ml Lysepuffer resuspendiert, mittels Microfluidizer aufgeschlossen und für 40 min bei 4°C und 24000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die nachfolgende Aufreinigung verwendet.

3.2.5.2 Proteinaufreinigung von GST-NF-YA₂₃₃₋₃₀₃

Für die Aufreinigung des GST-NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ erfolgte mittels GSH-Affinitätschromatographie. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 19 aufgeführt. Die 25 ml-GSH-Säule wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mit 2,5 Säulenvolumen (SV) Lysepuffer äquilibriert (2 ml/min), mit dem löslichen Proteinüberstand beladen und mit 4-5 SV Waschpuffer gewaschen. Die kompetitive Elution des GST-getaggen NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ erfolgte mittels GSH-haltigen Elutionspuffers. Die NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ enthaltenen Fraktionen, analysiert mittels Tricin-SDS-PAGE, wurden vereinigt, die Konzentration am NanoDrop gemessen und der GST-Tag mittels GST-Prescission (20 µg/ 5 mg Protein) üN bei 4°C am Drehrad abgeschnitten. Es folgte die Aufkonzentrierung mit Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten (MWCO 5-30 kDa) und die nachfolgende Aufreinigung mittels Größenausschuss-Chromatographie. Je nach Proteinmenge wurde eine HiLoad 16x60 S75 oder 26x60 S75-Säule verwendet. Die Gelfiltrationssäule wurde mit Gelfiltrations-Puffer äquilibriert (1-1,5 SV) und das aufkonzentrierte Protein über einen Loop beladen (1 ml/min Flussrate). Die Elution des Proteins erfolgte, nach dem Waschen, in 2 ml Fraktionen. Nach der Analyse der Fraktionen mittels Tricin-SDS-PAGE, wurden die Fraktionen mit dem Zielprotein vereinigt, aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.5.3 Proteinaufreinigung von 6xHis-NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀

Für die Aufreinigung der parallel exprimierten Fragmente 6xHis-NF-Y₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀ wurde die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie angewendet. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 20 aufgeführt. Die 2 ml Ni²⁺-NTA-Säule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min mit 3 Säulenvolumen Lysepuffer äquilibriert, mit dem löslichen Überstand des Zelllysats beladen und mit 10 SV Ni²⁺-NTA-Puffer gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mittels Imidazol-Gradienten (0 auf 100% (10 mM auf 300 mM), 20-30 SV, 1 ml/min). Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Tricin-SDS-PAGE hinsichtlich der Zielproteine analysiert, vereinigt und aufkonzentriert. Im Anschluss erfolgte die Gelfiltration an der Säule SuperdexTM 75 (HiLoad 16/60) oder SuperdexTM 75 (HiLoad 10/30). Die Gelfiltrationssäule wurde mit Gelfiltrations-Puffer äquilibriert (1-1,5 SV) und das aufkonzentrierte Protein über einen Loop beladen (1 ml/min Flussrate). Die Elution der Proteine erfolgte, nach dem

Waschen, in 1 ml Fraktionen. Nach der Analyse der Fraktionen mittels Tricin-SDS-PAGE, wurden die Fraktionen mit den Zielproteinen vereinigt, aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Des Weiteren wurde zu Optimierungszwecken die Ionenaustauscherchromatographie verwendet. Hierfür wurde das Protein umgepuffert (100 mM HEPES pH 8, 50 mM NaCl, 2 mM DTT) und der His-Tag üN mittels Prescission abgeschnitten. Der Proteinkomplex wurde auf die mit Puffer äquilibrierte Kationenaustauschersäule (HiTrap SP HP, GE Healthcare) geladen. Die Elution erfolgte mit Gradient von 50 mM auf 1 M NaCl (1 ml/min Flussrate). Die reinen Fraktionen mit dem Proteinkomplex, analysiert mittels Tricin-SDS-PAGE, wurden vereinigt, aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.5.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Für den Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) wurden die Proteinfragmente NF-YA₂₃₃₋₃₀₃, NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀ und ein Oligoduplex mit enthaltender CCAAT Box verwendet. Die Sequenz dieses Oligoduplexes basiert auf der Sequenz des Hsp70-Promotors und wurde mit den Restriktionsschnittstellen XhoII und HindIII versehen (5'-GATCCTCGAGTTCTGAGCCAATCACCGAGCTCGATAAGCTTGATC-3'). Die Oligonukleotide für den Oligoduplex wurden zusammengefügt, für 10 min bei 95°C erhitzt und im Anschluss für 1 h bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Ansätze wurden mit 5xBindingbuffer und Proteinpuffer angesetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Währenddessen wurde das nicht reduzierende Acrylamidgel bei 150 V für 40 min ohne Proben in 0,5x TBE Puffer laufengelassen, mit Proben beladen und im Kühlraum für ca. 50 min bei 75 V laufengelassen. Gefärbt wurde im Anschluss mit Ethidiumbromid und Coomassie. Die Etablierung des EMSAs erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Stefan Grote unter meiner Betreuung.

3.2.5.5 RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay (REMSA)

Der RNA-EMSA erfolgte mit aufgereinigter *in vitro* transkribierter PANDAR Vollängen RNA und den Proteinfragmente NF-YA₂₃₃₋₃₀₃, NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀. Hierfür wurde ein 1% Agarosegel mit 0,5% TBE verwendet, mit den Proben beladen und bei Raumtemperatur für 40 min bei 100 V aufgetrennt. Die RNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt.

3.2.6 Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation (PAR-CLIP)

Für die Analyse der an NF-YA bindenden RNAs bzw. der Identifizierung des RNA-Bindemotivs wurde die PAR-CLIP Methode verwendet (Spitzer et al., 2014). Bei dieser zellbasierten Methode erfolgt eine Inkorporation des Nukleosid-Analogs (hier: 4-Thiouridin; 4SU) in die neu transkribierte RNA. Die Bindung von Proteinen mit den RNAs, welche das 4SU eingebaut haben, wird durch die Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm) kovalent verknüpft. Eine nachfolgende spezifische Anreicherung des zu untersuchenden Proteins (hier: NF-YA) mit der kovalent gebundenen RNA mittels Immunopräzipitation und die Weiterverarbeitung der Proben ermöglicht die Analyse der RNAs. Im Rahmen der reversen Transkription der RNA zu komplementärer DNA (cDNA) kommt es aufgrund der kovalenten Bindung des Proteins an das 4SU zu T → C Mutationen innerhalb der cDNA. Die im Anschluss mittels Next Generation Sequencing ermittelten Daten werden bioinformatisch ausgewertet und gegen das Genom aligniert. Bei der Identifizierung des RNA-Bindemotifs spielen die zuvor erwähnten T → C Mutationen eine entscheidende Rolle, da sie die Region markieren bei der die RNA mit dem Protein interagiert hat.

Die Experimente wurden am Universitätsklinikum Düsseldorf in der Arbeitsgruppe von Jessica Hoell (Jessica Spitzer) von mir unter Anleitung von Dr. Kebria Hezaveh durchgeführt. Die erhaltenen Datensätze wurden von M.Sc. Andreas Klötgen verarbeitet und analysiert. Die Analyse der schematische Arbeitsablauf ist aufgrund der Komplexität in der Abbildung 10 aufgeführt und wird nachfolgend beschrieben.

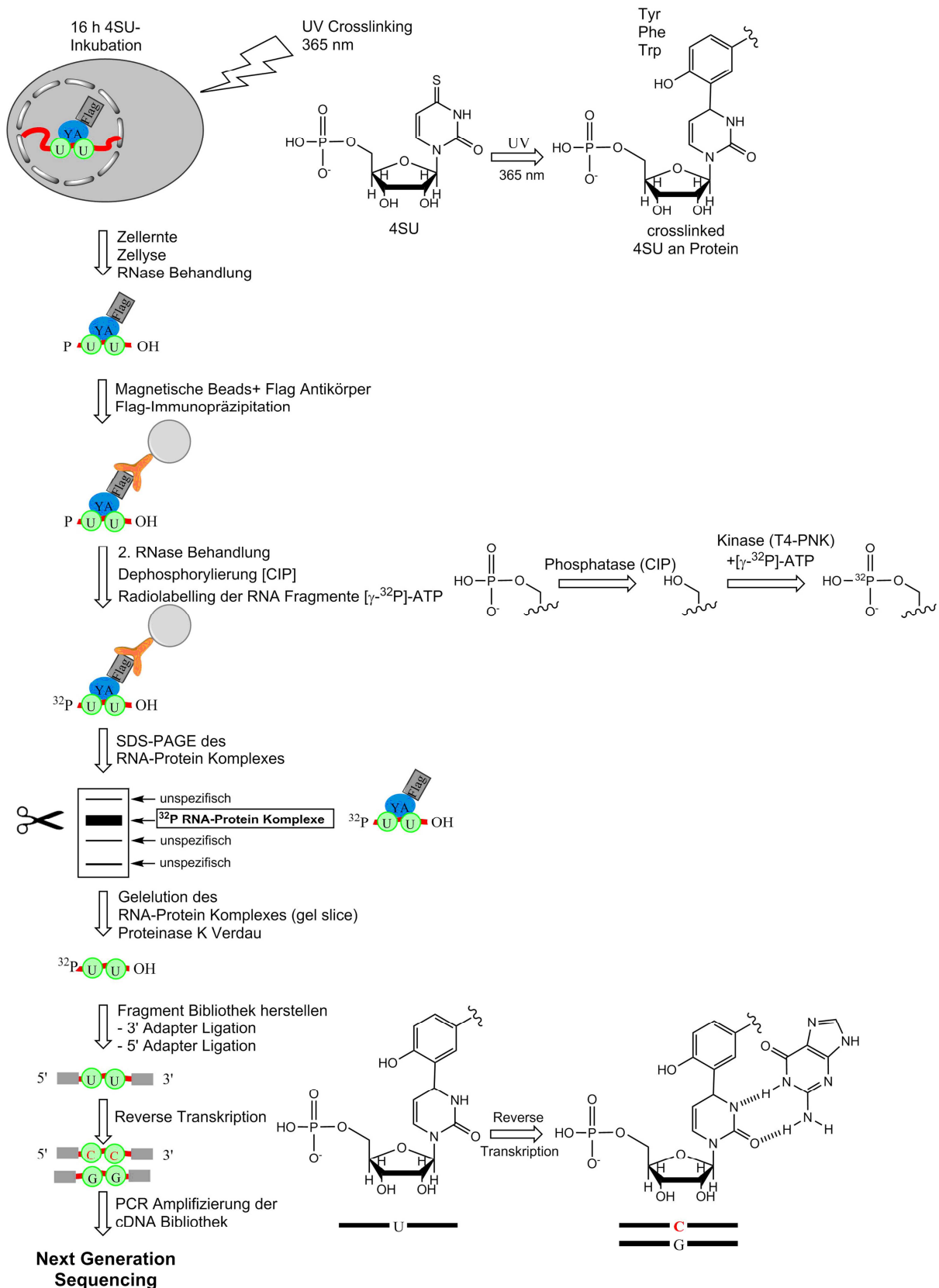


Abbildung 10: Schematischer Arbeitsablauf PAR-CLIP

Gezeigt ist der Ablauf des Flag-NF-YA PAR-CLIPS mit der Flag-Immunopräzipitation und nachfolgender Vorbereitung für die Identifizierung der gebundenen RNA-Fragmente. Die detaillierte Beschreibung der jeweiligen Schritte ist in Kapitel 3.2.6.1-3.2.6.10 aufgeführt.

3.2.6.1 Herstellung der Zellen

Verwendet wurde eine Flag-NF-YA stabile U2OS-Zelllinie, welche pro Experiment auf 25 Zellkulturplatten (15 cm Durchmesser) expandiert wurde. Bei Erreichen von 80% Konfluenz wurden die Zellen mit 200 ng/ml Doxorubicin für insgesamt 24 h behandelt. Nach 8-stündiger Doxorubicin-Inkubation, wurde zusätzlich 4-Thiouridin in einer finalen Konzentration von 100 μ M hinzugefügt und für 16 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und das PBS abgenommen. Es folgte die Zugabe von 5 ml PBS, das Platzieren der geöffneten Zellschale auf Eis und das kovalente Verknüpfen bei 365 nm und 0,15 J/cm². Im Anschluss wurden die Zellen mittels Zellschaber von der Platte gelöst, in ein 50 ml Tube überführt und auf Eis gelagert bis auch die letzte Platte geerntet werden konnte. Die Zellsuspensionen wurden bei 2000 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.6.2 Immunopräzipitation mit RNase Verdau

Für den Pull-Down wurden 105 μ l magnetischen Dynabeads-Protein G/10,5 ml Lysat verwendet. Diese wurden 2x mit Citrat-Phosphat-Puffer gewaschen, in 157,5 μ l Citrat-Phosphat-Puffer aufgenommen und mit 52,5 μ l Flag-Antikörper (Stock: 1 mg/ml) für 1 h am Drehrad bei 4°C inkubiert. Während der Inkubation der Beads mit dem Antikörper wurde das auf Eis aufgetaute Zellpellet mit 10,5 ml NP40-Lysepuffer für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das geklärte Zelllysate wurde mit 10,5 μ l RNase T1 (Stock: 1000 U/ μ l) für 15 min bei 22°C und anschließenden 5 min auf Eis inkubiert. Nach 2 Waschschritten der mit Antikörper-gekoppelten Beads mit je 1 ml Citrate-Phosphate-Puffer wurden diese in 210 μ l Citrate-Phosphat-Puffer aufgenommen und zu dem geklärten, mit RNase T1 behandelten Lysat gegeben und für 1 h bei 4°C am Drehrad inkubiert. Im Anschluss folgten 3 Waschschrritte mit je 1 ml IP-Waschpuffer, ein erneuter RNase T1-Verdau und anschließend 3 Waschschrritten mit IP-Waschpuffer.

3.2.6.3 Dephosphorylierung

Die nachfolgenden Arbeiten wurden im Radioaktivlabor durchgeführt. Für die Dephosphorylierung wurden die Beads in 1xNEB Puffer 3 mit 5,25 μ l CIP (Stock: 10 U/ μ l) in einem finalen Volumen von 105 μ l aufgenommen und für 10 min bei 37°C und 800 rpm

inkubiert. Nach je 2 Waschschritten mit je 1 ml Crosslink-Waschpuffer und je 1 ml PNK-Waschpuffer (+DTT), wurden die Beads in 105 μ l PNK-Waschpuffer (+DTT) resuspendiert.

3.2.6.4 Radiomarkierung und Phosphorylierung

Für die Radiomarkierung und Phosphorylierung wurden die Beads mit 5,25 μ l γ -P32-ATP (Stock: 10 uCi/ μ l) und 10,5 μ l T4-PNK (Stock: 10 U/ μ l) für 30 min bei 37°C und 800 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde 1,05 μ l ATP (Stock: 10 mM) hinzugefügt und weitere 5 min bei 37°C und 800 rpm inkubiert. Nach 5 Waschschritten mit je 1 ml PNK-Waschpuffer (ohne DTT) wurden die Beads in 1x SDS Probenpuffer aufgenommen und für die SDS-PAGE vorbereitet.

3.2.6.5 SDS-PAGE und Elektroelution

Für die SDS-PAGE wurden die Proben 5 min bei 95°C erhitzt, die Beads magnetisch abgetrennt und der Überstand in ein neues Eppi überführt. Die Proben wurden, neben den BioRad Precision Plus Dual Marker, auf ein NuPAGE Novex 12% Gel geladen und gelelektrophoretisch in MOPS-Puffer bei 200 V für 45-60 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel an den Ecken mit radioaktivem Marker, durch Einstechen mit einer Pipettenspitze, markiert und mittels Phosphorimager Film entwickelt. Die dem Flag-NF-YA zugehörigen Banden wurden mit Hilfe eines Ausdruckes des entwickelten Films ausgeschnitten und bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag erfolgte die Gel-Elektroelution mittels D-Tube Dialyzer Midi (cut-off 3.5 kDa). Nach der Inkubation der Membran mit 800 μ l H₂O für 5 min wurden die Gelstücke eingesetzt und mit 800 μ l 1x SDS Laufpuffer befüllt. Die Elektroelution erfolgte in einer Agarose-Gel Kammer mit speziellem Rackeinsatz im 1xSDS-Laufpuffer für 2 h bei 100 V und für 2 min mit Wechseln der Stromrichtung, um das Protein von der Membran zu lösen.

3.2.6.6 RNA Extraktion

Die geleluierte Lösung wurde in 2 Eppis aufgeteilt und dem Proteinase K Verdau unterzogen. Hierfür wurde zu jeder Probe 400 μ l 2xProteinase K Puffer und 48 μ l Proteinase K (Stock: 20 mg/ml) hinzugefügt und für 30 min bei 55°C inkubiert. Für die RNA Extraktion wurde im Anschluss 1 Volumen Phenol (pH 4,5):Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt, für 10 min bei 13000 rpm 4°C zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Eppi überführt. Diese wurde mit 1 Volumen Chloroform gemischt und für 10 min bei 13000 rpm 4°C

zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, erneut auf zwei Eppis aufgeteilt (Total=4), 1/10 Volumen 3 M NaCl, 1 µl GlycoBlue und 3 Volumen 100% EtOH hinzugefügt. Nach 1-stündiger Präzipitation bei -20°C und Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm 4°C, wurde der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet.

3.2.6.7 Ligation des 3'-Adapters

Für die 3'-Adapterligation wurden die getrockneten Pellets in 19 µl Ligationmix (2 µl 10x RNA Ligasepuffer ohne ATP, 6 µl 50% DMSO, 0,5 µl 3'-Adapter 100 µM, 10,5 µl H₂O) gepoolt. Als Kontrolle für die Ligationseffizienz wurde eine zusätzliche Ligation für den radiomarkierter Marker (RNA 19nt 19.39, 24nt 24.60) angesetzt. Die Proben wurden für 30 sec bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt, 1 µl T4 RNA Ligase 2 (Stock: 1 µg/µl) hinzugefügt, für 15-20 min auf Eis inkubiert und bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden 20 µl 2x RNA Ladepuffer hinzugefügt und die Proben auf ein denaturierendes 12% PAA Gel geladen. Als Größenstandard diente ligierter und unligierter RNA Marker (jeweils 2 µl in 40 µl Ladepuffer), welcher rechts und links auf dem Gel aufgetragen wurde. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1xTBE bei 20 W für 45-60 min. Anschließend wurde das Gel an den Ecken mit radioaktivem Marker, durch Einstechen mit einer Pipettenspitze, markiert und mittels Phosphorimager Film entwickelt. Die ligierten RNAs wurden mit Hilfe eines Ausdruckes des entwickelten Films ausgeschnitten und in ein neues Eppi überführt. Für die Gelelution der RNA wurden 400 µl 0,4 M NaCl zu den Gelstücken gegeben und bei 4°C für 15-20 h bei 1200 rpm inkubiert. Der RNA-haltige Überstand wurde anschließend in ein neues Eppi überführt und mit 1 µl GlycoBlue und 1 ml 100% EtOH für 1 h bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet.

3.2.6.8 Ligation des 5'-Adapters

Für die Ligation des 5'-Adapters wurde das Pellet in 9 µl H₂O aufgenommen. Als erneute Kontrolle der Ligation wurde der bereits 3'ligierte Marker (ebenfalls aus dem Gel extrahiert) in 12 µl H₂O aufgenommen, wobei 9 µl für die 5'-Ligation und 3 µl als unligierte Probe verwendet wurden. Für die 5'-Ligation wurden zu den Proben 9 µl Ligationmix (2 µl RNA Ligationspuffer ohne ATP, 1 µl 5'-Adapter 100 µM, 6 µl 50% DMSO) hinzugefügt, für 30 sec bei 90°C erhitzt und mit 2 µl T4 RNA Ligase für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mit 20 µl Formamid-Ladepuffer versetzt und auf 20 Wells eines 12% PAA Gels aufgetragen. Als Größenstandard diente der ligierte und unligierte Marker. Nach der

Gelelektrophorese (20 W für 45-60 min in 1xTBE Puffer) wurde das Gel mittels Phosphorimager Film entwickelt und das spezifische Gelstück erneut mit Hilfe eines Ausdrucks ausgeschnitten.

Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 300 µl 0,3 M NaCl und 1 µl 100 µM 3'-Adapter zur besseren Rückgewinnung bei 4°C üN unter Schütteln. Die eluierten Proben wurden mit 1 ml 100% EtOH für 1 h bei -20°C präzipitiert, bei 13000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet.

3.2.6.9 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde das Pellet in 5,6 µl H₂O aufgenommen, für 30 sec bei 90°C erhitzt, mit einem Mix aus 3 µl 5xFirst Strand Puffer, 1,5 µl 0,1 M DTT und 4,2 µl 10 mM dNTPs versetzt und für 3 min bei 50°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Reverse Transkription durch die Zugabe von 0,75 µl SuperscriptIII Reverse Transkriptase (Invitrogen) und anschließender Inkubation für 30 min bei 42°C.

3.2.6.10 PCR Amplifikation der cDNA

Im Anschluss wurde die cDNA mittels PCR amplifiziert, jedoch nicht bis zu Sättigung, was zuvor in einer Pilot-PCR getestet wurde. Die hergestellte cDNA wurde mit 80 µl H₂O verdünnt und nachfolgend für die PCR eingesetzt. Hierfür wurde ein Mastermix (50 µl 10x PCR Puffer, 50 µl 25 mM dNTPs, 2,5 µl 5'-Primer (100 µM), 2,5 µl 3'-Primer (100 µM), und 340 µl H₂O) angesetzt für die Pilot-PCR (100 µl) und die Haupt-PCR (400 µl).

Tabelle 39: Programm zur Amplifikation der cDNA

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	45 sec	30 Zyklen
Annealing	56°C	1 min 25 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation	72°C	7 min	
	4°C	Pause	

Die Proben wurden anschließend mittels Ethanolpräzipitation gefällt (6 µl 5 M NaCl/ 100 µl Reaktion; 3 Volumen 100% EtOH) und aufgereinigt. Die amplifizierte DNA wurde im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit geleluert. Die vorbereiteten Proben wurden anschließend durch Kebria Hezaveh für die Next Generation Sequencing Messung am Solexa vorbereitet und gemessen.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse der endogenen und induzierten *PANDAR* Expression in humanen Zelllinien

Um der Frage nachzugehen, ob sich das *PANDAR*-Expressionsprofil in humanen Zelllinien unterscheidet, wurden Analysen hinsichtlich des endogenen und mittels Doxorubicin-induzierten *PANDAR* Levels durchgeführt. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die lncRNA *PANDAR* in der Osteosarkomzelllinie U2OS die Zellviabilität beeinflusst.

Das Anthracyclin Doxorubicin ist ein Chemotherapeutikum das unter anderem zur Therapie von soliden Tumoren und hämatologischen Erkrankungen eingesetzt wird (Minotti, 2004). Die Wirkmechanismen basieren auf der DNA Interkalation, Inhibition der Topoisomerase II und Produktion freier Radikale. Die durch Doxorubicin-Behandlung hervorgerufenen DNA Schäden führen wiederum zu einer gesteigerten Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 (Meredith and Dass, 2016).

Im Rahmen von früheren *PANDAR*-Studien konnte gezeigt werden, dass die *PANDAR*-Transkription vom *CDKN1A* Promotor p53-abhängig ist (Hung et al., 2011). Um den Effekt von Doxorubicin, hinsichtlich des Zellüberlebens, zu untersuchen wurde eine Doxorubicin-Titration an einem Panel humaner Zelllinien durchgeführt. Die verwendete Doxorubicin-Konzentration von 200 ng/ml wurde basierend auf den Daten der Doxorubicin-induzierten *PANDAR* Expression von Fibroblasten gewählt (Hung et al., 2011) und auf eine maximale Konzentration von 1000 ng/ml titriert. Da für nachfolgende Experimente lebende Zellen benötigt wurden, wurde diese Konzentration nicht weiter erhöht.

Die Tumorzelllinien MCF7, HepG2, A549, U2OS, DU145 (p53^{P223L/V274F}) und U87 wurden mit unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen für 24 h behandelt und die Zellzahl mittels Kristallviolett-Assays analysiert (Abbildung 11). Die humanen Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs zeigten ein insgesamt Doxorubicin-konzentrationssabhängiges Zellüberleben bzw. eine Proliferationshemmung. Bei einer Konzentration von 200 ng/ml (345 nM) wiesen alle Zellen bis auf die MCF7 Zellen eine reduzierte Zellzahl auf. Mit steigenden Konzentrationen war die Zellzahl weiter reduziert und erreichte bei 1000 ng/ml einen Wert von 60% im Vergleich zu den jeweiligen nicht Doxorubicin-behandelten Zellen. Die MCF7 Zelllinie zeigte ein insgesamt anderes Zellverhalten unter Doxorubicin-Behandlung, da im Konzentrationsbereich von 200-600 ng/ml, im Vergleich zu den anderen Zelllinien, ein erhöhtes Zellüberleben bzw. eine geringere Proliferationshemmung zu beobachten war.

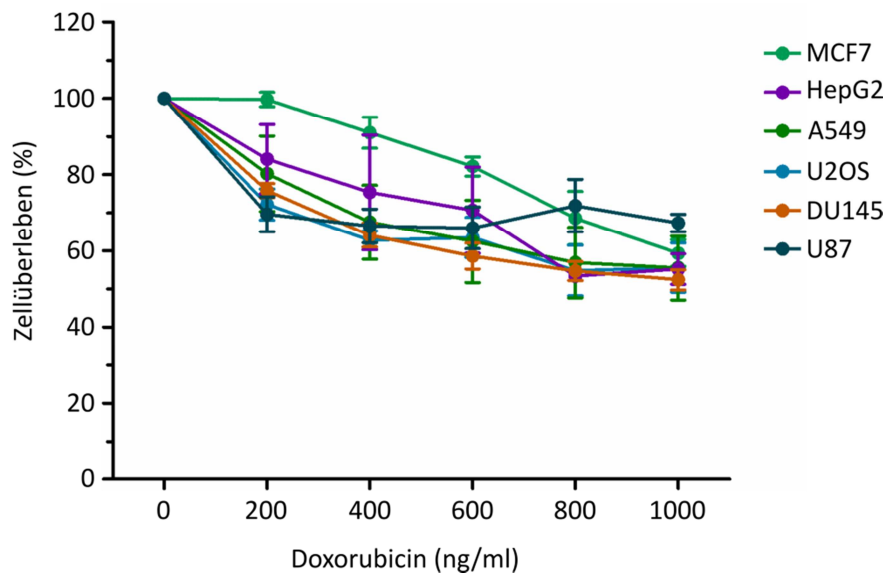


Abbildung 11: Doxorubicin-Titration humaner Zelllinien

Die Analyse des Kristallviolett-Assays der Zelllinien MCF7, HepG2, A549, U2OS, DU145 und U87 zeigt ein nach 24-stündiger Doxorubicin-Behandlung konzentrationsabhängiges Zellverhalten. Mit steigender Doxorubicin-Konzentration sinkt die Zellzahl der jeweiligen Zelllinien. Normiert wurde auf die jeweiligen unbehandelten Zellen (100%). n=3

Basierend auf den Ergebnissen des Doxorubicin-abhängigen Zellüberlebens, wurde im Anschluss das endogene und das durch Doxorubicin-induzierte Expressionsprofil der lncRNA *PANDAR* in einem humanen Zellpanel untersucht. Die Konzentration von 200 ng/ml Doxorubicin wurde ausgewählt, da in diesem Konzentrationsbereich bereits eine verstärkte Expression des p53 Proteins zu beobachten war (Anhang Abbildung 34). Für die Analyse des *PANDAR* Levels wurde die totale RNA der Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative Real Time PCR durchgeführt, wobei das *PANDAR* Level auf das Referenzlevel von *GAPDH* normiert wurde (Abbildung 12).

Für die Charakterisierung der endogenen *PANDAR* Expression wurden die Tumorzelllinien (Tabelle 10) U373 (p53^{R273H}), A549, U2OS, HCT116, MCF7, U87, DU145 (p53^{P223L/V274F}), HT29 (p53^{R273H}), HepG2, Fibroblasten BJ und immortalisierte Fibroblasten BJ mut (H-Ras^{G12V} SV40TL htert) relativ zur Zelllinie mit der geringsten *PANDAR* Expression (U373, relative Quantität (Rq)= 1) gegenübergestellt (Abbildung 12A). Ein relativ ähnliches *PANDAR* Expressionslevel (Rq 1-2) ergab sich für die Zelllinien U373, A549, U2OS, HCT116, MCF7, U87 und BJ. Im Gegensatz dazu konnte für die Zelllinien DU145 (Rq 2,6), HT29 (Rq 5,3), HepG2 (Rq 6,7) und BJ mut (H-Ras^{G12V} SV40TL htert) (Rq 3,5) ein erhöhtes *PANDAR* Level beobachtet werden.

Da die Transkription der lncRNA *PANDAR* durch die Bindung von p53 an den *CDKN1A* Promotor verstärkt werden kann, wurden die Zellen mit 200 ng/ml (~345 nM) Doxorubicin

behandelt, wodurch das p53 Proteinlevel verstärkt wird (Anhang Abbildung 34). Zur Bestimmung des richtigen Zeitraums für die *PANDAR* Expression nach der Doxorubicin-Zugabe, wurde die Zelllinie U87 (p53 Wildtyp) verwendet und das *PANDAR* Level nach 0, 3, 6, 9, 12, 16 und 24 Stunden analysiert (Abbildung 12B). In dem Zeitraum von 3 bis 16 Stunden blieb das *PANDAR* Level insgesamt unverändert, erst nach 24 Stunden stieg es im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h um das 4-fache an. Aus diesem Grunde wurde das *PANDAR* Level des Zellpanels nach 24-stündiger Doxorubicin-Behandlung (200 ng/ml) untersucht und auf die jeweilige nichtbehandelte Kontrolle normiert (Abbildung 12C). Die Doxorubicin-induzierte Expression von *PANDAR* zeigte Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Das *PANDAR* Level in den Zelllinien MCF7 und HT29 (p53^{R273H}) blieb trotz des DNA-Schadens unverändert, wohingegen für die anderen Zelllinien eine Zunahme der *PANDAR* RNA beobachtet werden konnte. Bei den Zelllinien BJ mut, A549, DU145 (p53^{P223L/V274F}) und HepG2 lag eine zwei- bis drei-fache Steigerung des *PANDAR* Levels vor. Darüber hinaus ergab sich für die Zelllinien U373 (p53^{R273H}), U2OS, HCT116, U87 und BJ eine zum Teil mehr als vier-fache Steigerung des *PANDAR* Levels verglichen zu den jeweiligen Kontrollen.

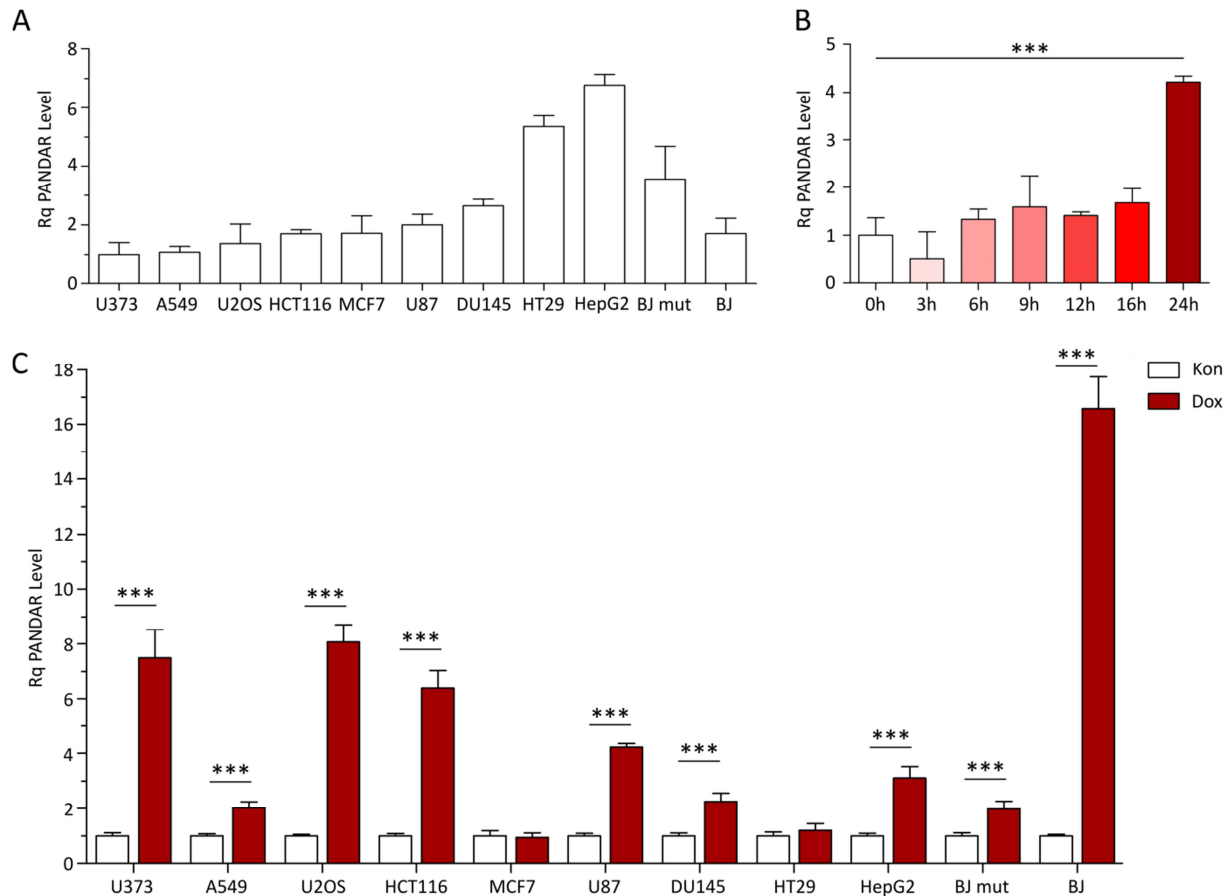


Abbildung 12: Endogene und Doxorubicin-induzierte *PANDAR* Expression in humanen Zelllinien

(A) Die qPCR Analyse des endogenen *PANDAR* Levels zeigt eine zelllinienabhängige Expression. Normiert wurde auf die Glioblastomzelllinie U373 mit der geringsten *PANDAR*-Expression. Die höchsten endogenen *PANDAR* Level weisen die Zelllinien HepG2 und HT29 auf. (B) Die zeitabhängige Induktion der *PANDAR* RNA durch 200 ng/ml Doxorubicin zeigt in der Glioblastomzelllinie U87 den höchsten Anstieg an *PANDAR* RNA nach 24 h. (C) Die Analyse der *PANDAR* RNA nach 24-stündiger Doxorubicin-Behandlung (Dox; 200 ng/ml) zeigt eine zelllinienabhängige *PANDAR* Expression. Für die Zelllinien MCF7 und HT29 ist kein erhöhtes *PANDAR* Level durch Doxorubicin zu beobachten. Normiert wurde auf die jeweilige nicht behandelte Kontrolle (Kon). Vorhandene p53 Mutation: DU145 (p53^{P223L/V274F}), U373 (p53^{R273H}), HT29 (p53^{R273H}) Rq= relative Quantität (*PANDAR*/*GAPDH*), BJ mut (H-Ras^{G12V} SV40TL htert). n=3; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Für weitergehende Experimente wurde eine Zelllinien mit einer konstitutiven *PANDAR* Überexpression benötigt. Aufgrund der guten Proliferationsrate, Transfektionseffizienz und Doxorubicin-induzierten *PANDAR* Expression (Abbildung 12) wurden die Osteosarkomzellen U2OS verwendet. Diese wurden mit einem *PANDAR*-kodierenden Plasmid transfiziert, selektiert und klonal expandiert. Bei der Analyse der stabilen *PANDAR* überexprimierenden U2OS Zelllinie zeigte sich eine 500-fache Überexpression der *PANDAR* RNA gegenüber den wildtypischen U2OS Zellen (Abbildung 13A). Die vergleichende Analyse der wildtypischen mit *PANDAR*-U2OS Zellen, hinsichtlich ihres Zellüberlebens auf verschiedene Doxorubicin-

Konzentrationen (24 h), zeigte keinen signifikanten Unterschied im initialen Kristallviolett-Assays (Abbildung 13B). Zur Überprüfung ob die endogene *PANDAR* Expression mit der Zellviabilität korreliert, wurde ein siRNA-Knockdown von *PANDAR* in wildtypischen U2OS Zellen durchgeführt. Nach 48-stündiger transients Transfektion konnte ein um ~65% reduziertes *PANDAR* Level, im Vergleich zur siRNA-Kontrolle, beobachtet werden (Abbildung 13C). Darüber hinaus wurde der Effekt des *PANDAR* Knockdowns mittels initialem WST-Assays in wildtypischen U2OS-Zellen analysiert. Hierbei zeigte sich nach 48 h eine reduzierte Zellviabilität von *PANDAR*-siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen (Abbildung 13D).

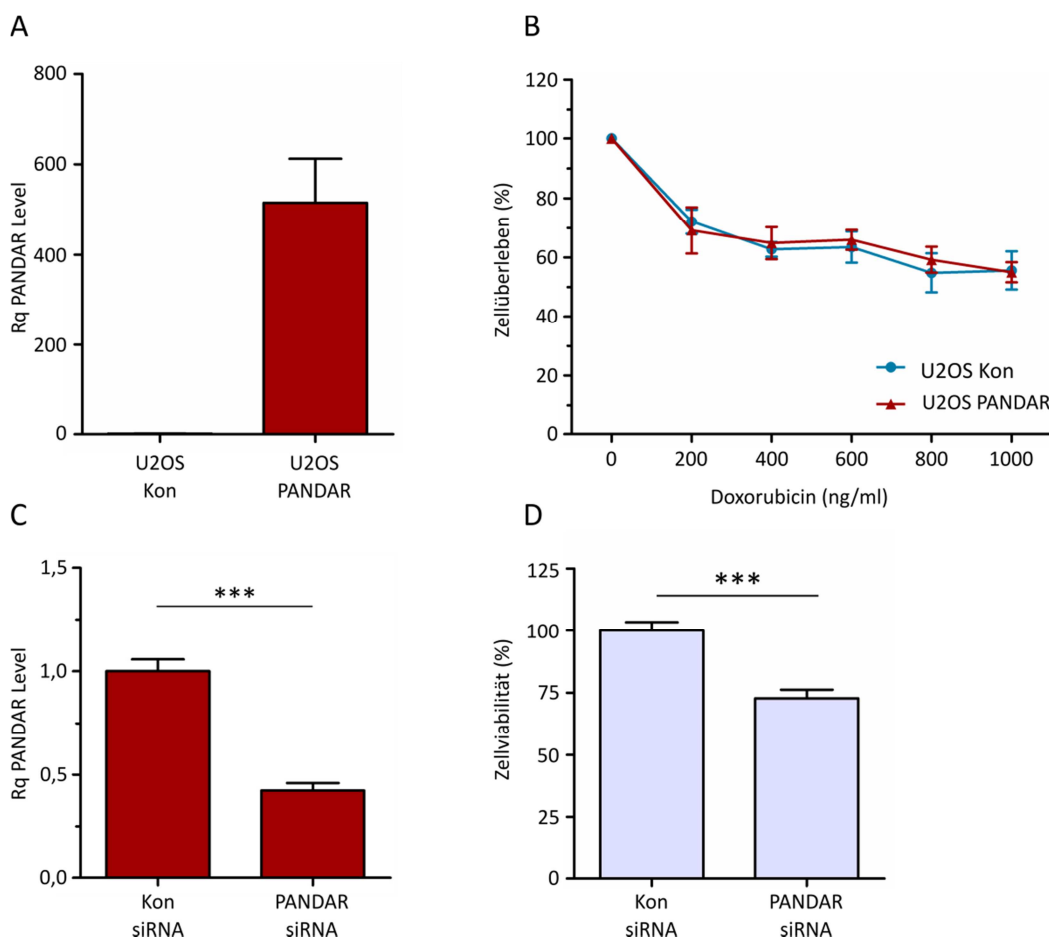


Abbildung 13: Analyse der *PANDAR*-abhängigen Zellviabilität

(A) Die qPCR Analyse der stabilen *PANDAR* überexprimierenden U2OS-Zellen zeigt ein 500-fach erhöhtes *PANDAR* RNA Level, im Vergleich zu wildtypischen U2OS Zellen (Kon) (repräsentative Daten). (B) Die Analyse des Kristallviolett-Assays zeigt keinen Unterschied im Zellüberleben zwischen wildtypischen U2OS und *PANDAR*-U2OS Zellen durch 24-stündige Behandlung verschiedener Doxorubicin-Konzentrationen. n=3 (C) Der 48-stündige transiente Knockdown von *PANDAR* in wildtypischen U2OS Zellen erzielt eine Knockdowneffizienz von ~65% im Vergleich zur Kontroll-siRNA (Kon). n=3 (D) Die WST-Assay Analyse von wildtypischen U2OS Zellen nach 48-stündigen *PANDAR* Knockdowns zeigt eine reduzierte Zellviabilität verglichen zur Kontrolle, n=3. Eine Messung des biologischen Triplikats des WST-Assays (D) wurde von Hannah Cibis durchgeführt. Rq= relative Quantität (*PANDAR*/*GAPDH*), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

4.2 Der trimere Nuklear Transkription Faktor-Y Komplex

Um zu überprüfen, ob die lncRNA *PANDAR* mit der NF-YA Untereinheit oder im trimeren NF-Y Komplex interagiert, wurden *PANDAR*-NF-Y Interaktionsstudien durchgeführt. Ein weiterer Aspekt umfasste die Identifizierung des RNA-Bindemotivs der NF-YA Untereinheit mittels PAR-CLIP.

4.2.1 Expression und Aufreinigung von NF-Y Untereinheiten

Der trimere Komplex des Nuklear Transkription Faktor Y (NF-Y) besteht aus den 3 Untereinheiten NF-YA, NF-YB und NF-YC. Für die biochemische Charakterisierung dieses Proteinkomplexes mittels *in vitro* Experimenten wurde die Expression und Aufreinigung der Untereinheiten etabliert. Die verwendeten Fragmentgrenzen NF-YA₂₃₃₋₃₀₃, NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀ (Abbildung 8A) basieren auf Nardini et al. 2013. Die Etablierung der NF-YA bzw. NF-YB/NF-YC Aufreinigung erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Stefan Grote bzw. der Masterarbeit von Philine Hagel unter meiner Betreuung.

4.2.1.1 NF-YA

Die Expression des N-terminal getaggtten GST-NF-YA Fragments 233-303 erfolgte mit Hilfe des pGex-6p2 in *E.coli* BL21(DE3)RIL Zellen. Nach dem Aufschluss der Zellen wurde das geklärte Zelllysate mittels GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Methoden-Kapitel 3.2.5.2). Das GST-NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ Fusionsprotein (35 kDa) wurde von der Säule eluiert und auf 35 ml mit 18 mg/ml aufkonzentriert. Die SDS-PAGE Analyse zeigte reines Fusionsprotein mit einer Größe von 25-30 kDa (Abbildung 14A). Da für den weiteren Verlauf NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ (erwartete Größe: 8,5 kDa) ohne GST-Tag von Interesse war, wurde der GST-Tag über Nacht mittels Prescission Protease an der integrierten Prescission Schnittstelle abgeschnitten und im Anschluss mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) voneinander separiert (Abbildung 14B,C). Die Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE zeigte die erfolgreiche Abtrennung von GST (Fraktion C1-D5) und dem NF-YA Fragment (D6-E10, beobachtete Größe: 13 kDa). Da ab Fraktion E8 ein NF-YA-Abbau beobachtet werden konnte, wurden nachfolgend die NF-YA Fraktionen D8-E7 vereinigt und auf 9,5 ml mit 3 mg/ml aufkonzentriert. Somit konnten aus der 5 l Expression 28,5 mg reines NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ Protein gewonnen werden.

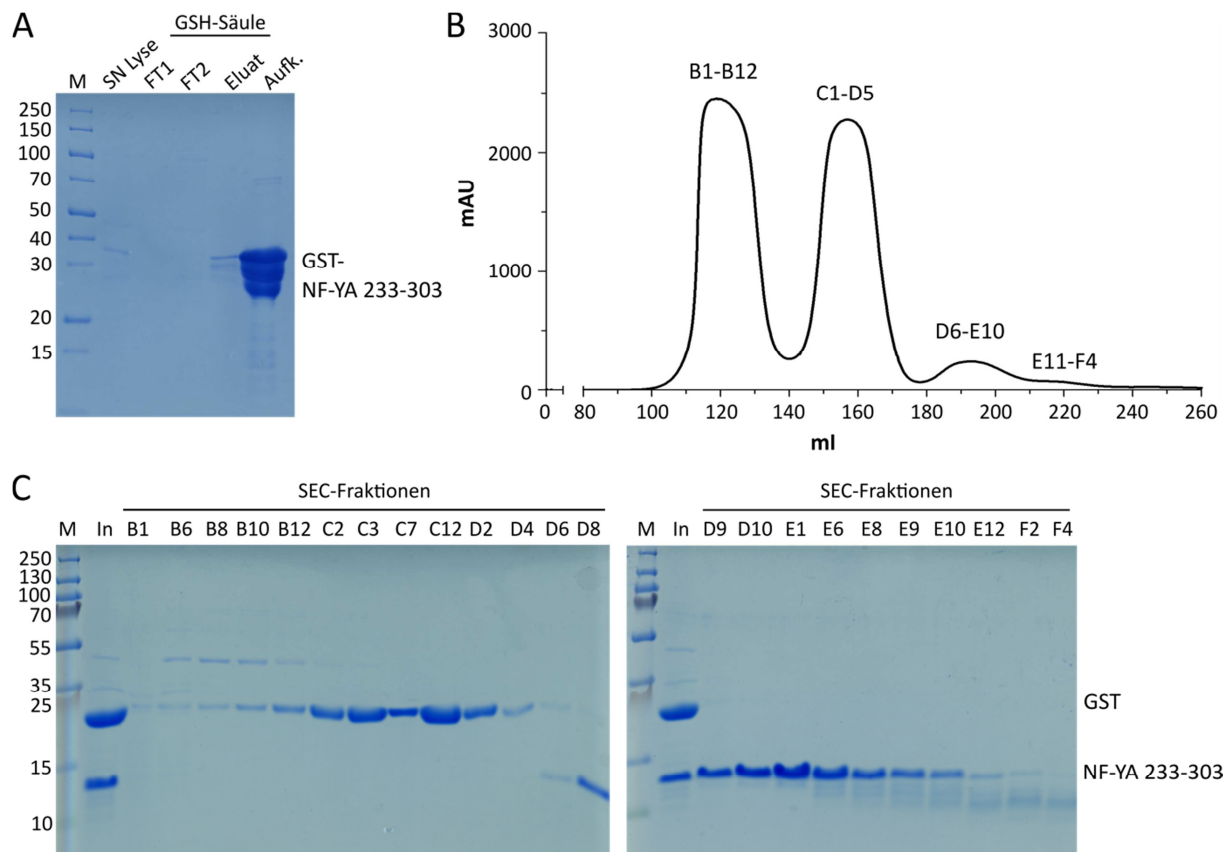


Abbildung 14: Aufreinigung von NF-YA₂₃₃₋₃₀₃

Die Aufreinigung des in *E.coli* BL21(DE3)RIL Zellen exprimierten GST-NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ erfolgte mittels GSH-Säule und Größenausschlusschromatografie. (A) Die SDS-PAGE Analyse zeigt das Fusionsprotein GST-NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ (35 kDa) im Lysat (SN Lyse), Eluat und nach der Aufkonzentrierung des Eluats. Im Anschluss wurde der GST-Tag des aufkonzentrierten Eluats über Nacht mittels Prescission Protease an der integrierten Prescission Schnittstelle abgetrennt. (B) Die nachfolgende Aufreinigung, des vom GST (~26 kDa) getrennten NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ (8,5 kDa), mittels Größenausschlusschromatografie (SEC) ist im Elutions-Chromatogramm dargestellt und zeigt zwei voneinander getrennte Peaks. (C) Die SDS-PAGE Analyse zeigt in den Fraktionen B1-D4 abgetrenntes GST und reines NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ in den Fraktionen D8-E10. Aufgrund des zunehmenden NF-YA-Abbaus wurden die Proben ab Fraktion E8 verworfen und die Fraktionen D8-E7 verwendet. Die Etablierung dieser Aufreinigung erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Stefan Grote unter meiner Betreuung. M: Marker [kDa], In: Input, SN: Überstand, FT: Durchfluss

4.2.1.2 NF-YB/ NF-YC

Die Expression der Fragmente NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀ erfolgte im heterodimeren Komplex im pACYC-Duet Plasmidsystem in *E.coli* BL21(DE3) Zellen, wobei das NF-YB Fragment N-terminal mit einem 6xHis-Tag getaggt war. Nach der Zelllyse wurde das geklärte Lysat mittels Ni²⁺NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Methoden-Kapitel 3.2.5.3). Der heterodimere Komplex wurde durch einen Imidazolgradienten von der Säule eluiert und die erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Die Peaks des Chromatogramms (Abbildung 15A) zeigen die Elution von 6xHis-NF-YB₅₁₋₁₄₃ (15,5 kDa) und NF-YC₂₇₋₁₂₀ (12,8 kDa) in den Fraktionen C2-G6 (Abbildung 15B). Da in den Fraktionen eine

unterschiedliche Reinheit und Konzentration der 6xHis-NF-YB und NF-YC Fragmente beobachtet werden konnte, wurden die eluierten Fraktionen C10-D8 und D9-G6 getrennt voneinander vereinigt und weiter verarbeitet. Der bereits saubere Eluat-Pool D9-G6 wurde, zur Abtrennung von noch vorhandenen Verunreinigungen, der Größenausschlusschromatographie (SEC) unterzogen (Abbildung 15C, D). Das Chromatogramm und die SDS-PAGE Analyse der Größenausschlusschromatographie ergab saubere Fraktionen für die Fraktionen B9-C8, sodass diese vereinigt und auf 3 ml mit einer Konzentration von 1,5 mg/ml aufkonzentriert werden konnten. Der Eluat-Pool C10-D8 wurde der Ionenaustauschchromatographie (IEX) unterzogen (Abbildung 15E, F). Hierfür wurde das Eluat auf 100 mM HEPES pH 8,0, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ umgepuffert und der His-Tag mittels Prescission Protease an der integrierten Prescission Schnittstelle über Nacht abgeschnitten. Im Anschluss wurde die Kationenaustauschersäule mit dem Proteinkomplex beladen und mit einem Salzgradienten von 50 mM auf 1 M eluiert. Das Chromatogramm (Abbildung 15E) und die SDS-PAGE Analyse (Abbildung 15F) zeigt für die Fraktionen C11-D1 reines NF-YB₅₁₋₁₄₃ (10,9 kDa) und NF-YC₂₇₋₁₂₀ (12,8 kDa). Die Fraktionen wurden vereinigt und auf 1 ml mit einer Konzentration von 0,773 mg/ml aufkonzentriert.

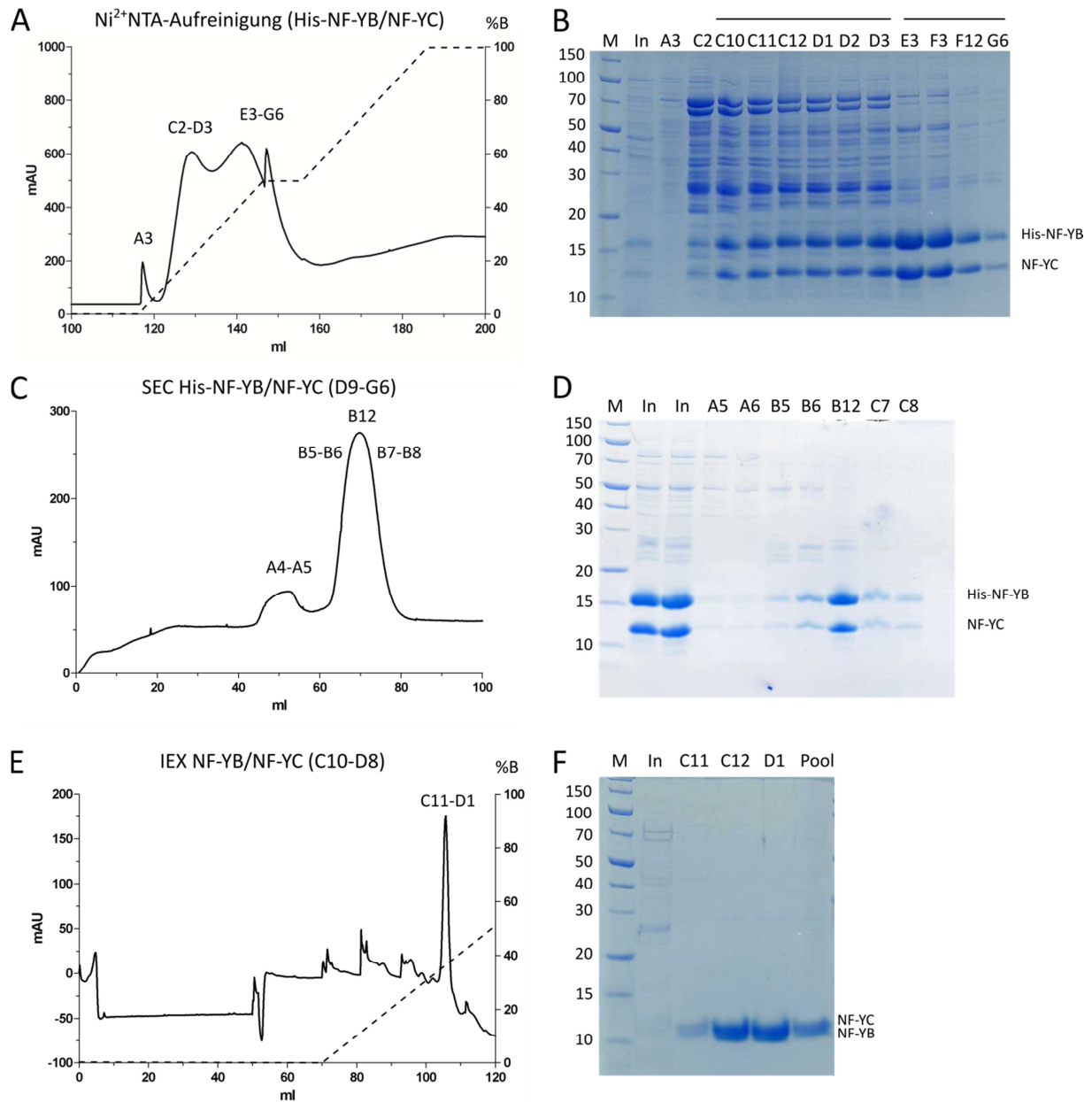


Abbildung 15: Aufreinigung von co-exprimiertem 6xHis-NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀

Die Aufreinigung der in *E.coli* BL21(DE3) Zellen exprimierten heterodimeren Fragmente 6xHis-NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀ erfolgte initial mittels His-Tag über die Ni^{2+} NTA-Säule. (A,B) Das Imidazolelutions-Chromatogramm der Ni^{2+} NTA-Säule und die Analyse der SDS-PAGE zeigt die Elution von 6xHis-NF-YB₅₁₋₁₄₃ (15,5 kDa) und NF-YC₂₇₋₁₂₀ (12,8 kDa) in den Fraktionen C2-G6. Aufgrund der verschiedenen Reinheit wurden die Fraktionen C10-D8 und D9-G6 gepoolt und getrennt weiter verarbeitet. (C,D) Die anschließende Reinigung des Ni^{2+} NTA Pools D9-G6 mittels Größenausschlusschromatografie (SEC) weist in den Fraktionen B9-C8 reines 6xHis-NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀ auf. (E,F) Die Aufreinigung des Precision behandelten Ni^{2+} NTA Pools C10-D8 mittels Kationenaustauscher (IEX) und Salzgradient-Elution (50 mM auf 1 M) zeigt reine Fraktionen in C11-D1 für NF-YB₅₁₋₁₄₃ (10,9 kDa) und NF-YC₂₇₋₁₂₀ (12,8 kDa). Die Etablierung dieser Aufreinigung erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Philine Hagel unter meiner Betreuung. M: Marker [kDa], In: Input

4.2.2 Komplexbildung von NF-Y mit DNA und *PANDAR* RNA

Zur Überprüfung der Bildung des NF-Y Trimers und der Funktionalität der aufgereinigten NF-Y Fragmente wurden Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) durchgeführt. Hierfür wurde der trimere Komplex geformt und mit einem DNA-Oligoduplex mit erhaltener CCAAT-Bindestelle konzentrationsabhängig titriert (Abbildung 16). Die Ethidiumbromid-Färbung des nativen Acrylamid-Gels zeigte eine Laufweitenverschiebung des DNA-Protein Komplexes im Vergleich zur nicht gebundenen DNA. Bei einem äquimolaren Verhältnis von Protein zu DNA lag keine freie DNA mehr vor. Zusätzlich war sowohl in der Ethidiumbromid- als auch in der Coomassie-Färbung zu beobachten, dass mit sinkender DNA-Konzentration die Menge des DNA-Protein Komplexes abnahm.

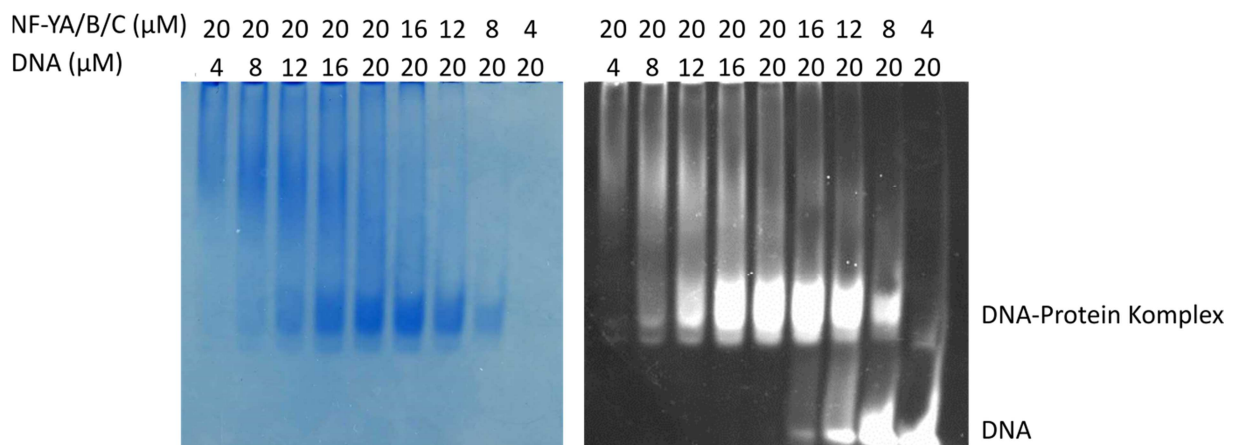


Abbildung 16: Formierung des NF-Y-DNA Komplexes

Die Titration des NF-Y Trimers (NF-YA₂₃₃₋₃₀₃, NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀) und CCAAT-DNA-Oligoduplex mittels EMSA zeigt eine vollständige Interaktion bei äquimolaren Konzentrationen. Links: Coomassie-Färbung, rechts: Ethidiumbromid-Färbung. Die Etablierung und Durchführung des NF-Y/ DNA EMSAs erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Stefan Grote unter meiner Betreuung.

Die Interaktion der lncRNA *PANDAR* mit dem Transkriptionsfaktor NF-YA wurde bereits in der Literatur beschrieben (Hung et al., 2011; Puvvula et al., 2014). Hierbei wurde jedoch nicht geklärt, ob es sich um eine direkte Bindung von *PANDAR* an NF-YA oder auch an den trimeren NF-Y Komplex handelt. Um diese Fragestellung zu klären, wurde ein RNA-Electrophoretic Mobility Shift Assay (REMSA) mit *in vitro* transkribierter *PANDAR* RNA und aufgereinigtem NF-Y Protein (NF-YA₂₃₃₋₃₀₃, NF-YB₅₁₋₁₄₃, NF-YC₂₇₋₁₂₀) durchgeführt (Abbildung 17). Die *PANDAR* RNA wurde hierbei durch Ethidiumbromid-Färbung detektiert. Der REMSA zeigte eine Laufweitenverschiebung von *PANDAR* RNA mit NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ bzw. dem NF-Y trimeren Komplex aufgrund der Größenzunahme des Komplexes, im Vergleich

zur *PANDAR* RNA alleine. Im Gegensatz dazu ergab die Inkubation des NF-YB/ NF-YC Heterodimers mit *PANDAR* RNA keine Laufweitenverschiebung der RNA.

PANDAR	-	-	-	+	+	+	+
NF-YA	+	-	+	-	+	-	+
NF-YB/YC	-	+	+	-	-	+	+

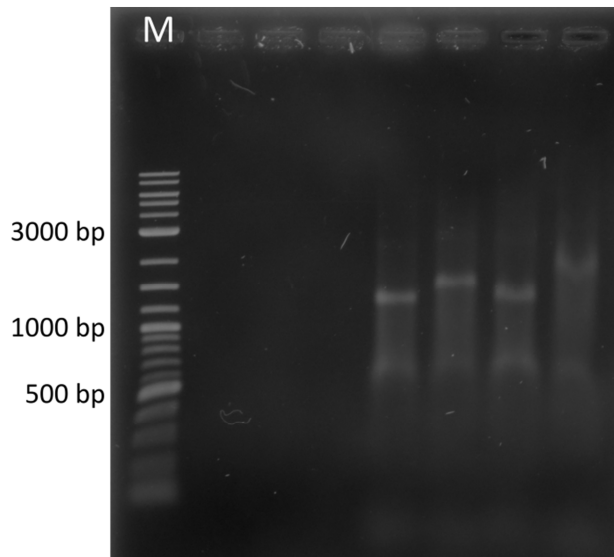


Abbildung 17: Interaktion der *PANDAR* RNA mit aufgereinigtem NF-Y Protein

Das native Ethidiumbromid-gefärbte Gel zeigt die Interaktionsanalyse der *in vitro* transkribierten *PANDAR* RNA an NF-Y Fragmente (NF-YA₂₃₃₋₃₀₃, NF-YB₅₁₋₁₄₃, NF-YC₂₇₋₁₂₀) mittels REMSA. Durch die Interaktion von *PANDAR* RNA mit NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ und mit dem NF-Y trimeren Komplex kommt es zu einer Laufweitenverschiebung von *PANDAR*. Der NF-YB/NF-YC Heterodimer weist keine *PANDAR*-Bindung auf. Verhältnis: 0,25 μ M *PANDAR* RNA, 1,5 μ M Protein. Zur Überprüfung der Laufweitenverschiebung der RNA wurde DNA Marker (M) aufgetragen.

4.2.3 Identifizierung des RNA-Bindemotivs von NF-YA mittels PAR-CLIP

Zur Analyse des RNA-Bindemotivs von NF-YA wurde die biochemische Methode Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation (PAR-CLIP) durchgeführt (Methoden-Kapitel 3.2.6). Das Experiment wurde dreimalig mit der stabilen Flag-NF-YA U2OS Zelllinie (Anhang Abbildung 33) durchgeführt, wobei in dem zweiten Durchlauf zwei Experimente parallel durchgeführt wurden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Behandlung von Doxorubicin in U2OS-Zellen zu einem erhöhten *PANDAR* Level führt (Abbildung 12C), wurde die stabile Flag-NF-YA Zelllinie im zweiten Durchlauf (n=2) mit Doxorubicin behandelt, um eine Überexpression von *PANDAR* hervorzurufen. Bei den hier dargestellten Daten handelt es sich um die mit Doxorubicin-behandelten Zellen.

Die stabile Flag-NF-YA U2OS Zelllinie wurde mit 200 ng/ml Doxorubicin behandelt, wobei nach 8 Stunden 4-Thio-Uridin hinzugefügt und nach weiteren 16 Stunden die RNA-Protein Interaktion mittels UV Licht kovalent verknüpft wurde. Nach erfolgter Flag-

Immunopräzipitation, RNase Behandlung und der Radiomarkierung mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, wurde die Probe mittels denaturierender SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 18A). Bei der hierbei erhaltenen Bande handelte es sich um die kovalent verknüpften NF-YA-RNA Komplexe, wobei der zuvor durchgeführte RNase Verdau die ungebundenen und damit ungeschützten RNA-Bereiche, welche nicht vom Protein bedeckt waren, geschnitten hat. Bei der zweiten darüber liegenden Bande handelte es sich vermutlich um ein Protein, welches mit NF-YA interagiert und dadurch auch angereichert wurde. Die gelulierte und Proteinase K verdaute Probe wurde im Anschluss mit dem 3'-Adapter ligiert und mit einem Urea Gel aufgetrennt (Abbildung 18B). Als Richtwert für die Größe der 3'-ligierten RNA wurde ein 19 nt und 24 nt RNA Marker ebenfalls 3'-ligiert und auf das Gel aufgetragen. Die 3'-Ligation der zu untersuchenden RNA zeigte aufgrund der geringen Radioaktivität kein Signal, jedoch konnte anhand der 3'-ligierten Marker-Banden das benötigte Gelstück der NF-YA interagierenden RNA Fragmente ausgeschnitten werden. Es folgte die Gelelution der 3'-ligierten RNA Fragmente und die zusätzliche 5'-Ligation mit 5'-Adapter. Wie bereits nach der 3'-Ligation konnte aufgrund der geringen Radioaktivität kein Signal nach der 5'-Ligation für die Proben beobachtet werden (Abbildung 18C). Die Größe der 3'- und 5'-ligierten RNA Fragmente, welche an NF-YA gebunden vorlagen, konnten mit Hilfe der 3'- und 5'-ligierten Markerbanden detektiert, ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert werden.

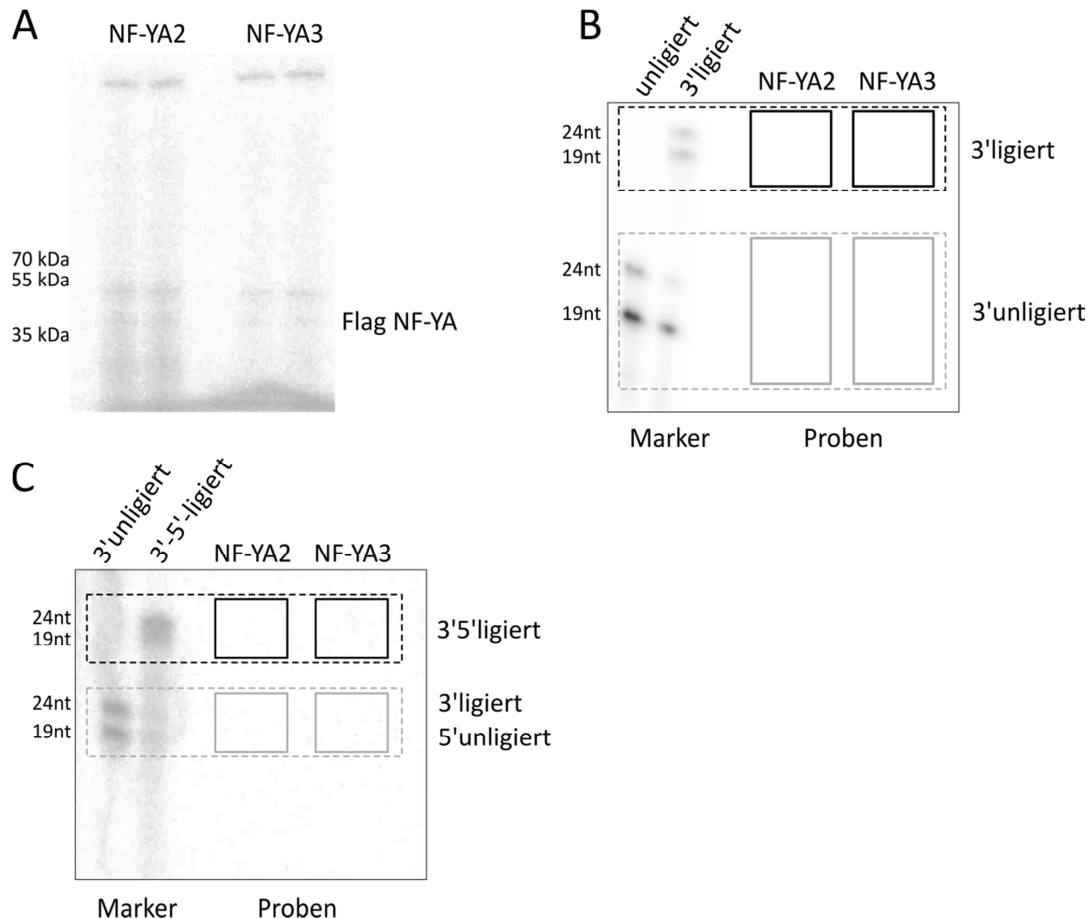


Abbildung 18: Präparative Gele des Flag-NF-YA PAR-CLIPs Nr.2

Die mit 200 ng/ml Doxorubicin (24 h) und 4-Thio-Uridin (16 h) inkubierte stabile Flag-NF-YA Zelllinie wurde nach der kovalenten Verknüpfung lysiert, für die Flag-Immunopräzipitation eingesetzt, RNase behandelt und radiomarkiert. (A) Das SDS-Gel des kovalent verknüpften und 5'-radiomarkierten RNA-Protein-Immunopräzipitats zeigt die radioaktiv markierte Bande mit erwarteter Größe von Flag-NF-YA (~37 kDa). Das Urea Polyacrylamidgel nach der 3'-Adapterligation (B) und 5'-Adapterligation (C) der RNA-Fragmente zeigt die ausgeschnittenen Bereiche der mittels NF-YA immunopräzipitierten RNAs, wobei der 3'-(B) und 3'5'-(C) ligierte Bereich (schwarze Box) für die Weiterverarbeitung verwendet wurden. Als Größenstandard diente der ligierte und unligierte Größenmarker (links).

Nach der 3'- und 5'-Ligation der an NF-YA gebundenen RNA Fragmente folgte die cDNA Synthese mittels reverser Transkription und die anschließende Amplifikation der erhaltenen cDNA Bibliothek mittels PCR. Die amplifizierte cDNA Bibliothek, der an NF-YA gebundenen RNA Fragment, wurde im Anschluss mittels der Illumina Next Generation Sequencing (NGS) Methode durch Dr. Kebria Hezaveh (AG Hoell, UK Düsseldorf) durchgeführt. Die erhaltenen Datensätze wurden von M.Sc. Andreas Klötgen (AG Hoell, UK Düsseldorf) verarbeitet und analysiert. Jeder Datensatz wurde separat behandelt und analysiert. Nach der Eliminierung der minderwertigen Enden und der freien Primer-Adapter ergab sich die Verteilung der Daten-Clusterlängen, welche die Länge der an NF-YA gebundenen RNA Fragmente widerspiegelt (Abbildung 19). Zu sehen sind Cluster des

Replikats 1 (Abbildung 19A) und der zusammengefassten Replikate 2 und 3 (Abbildung 19B) mit 14-31 nt, wobei der Hauptpeak bei ca. 20 nt liegt.

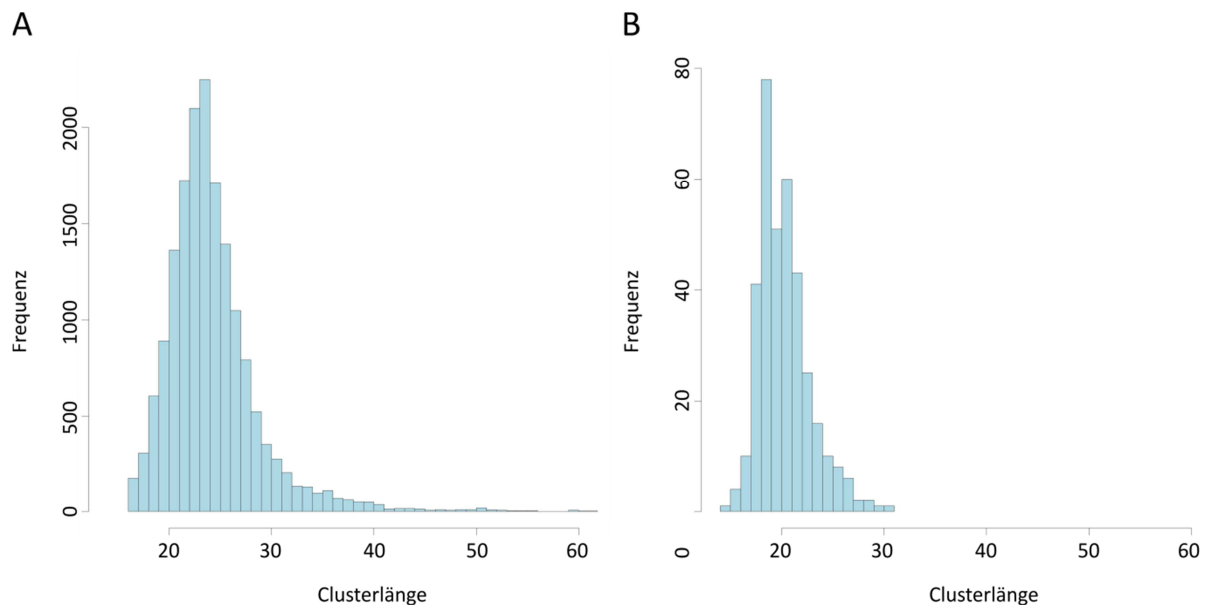


Abbildung 19: Verteilung der analysierten Daten-Clusterlänge der NGS Ergebnisse

(A,B) Die Next Generation Sequencing (NGS) Daten der Flag-NF-YA PAR-CLIP Replikate 1 (A) und 2+3 (B) zeigen, nach der Eliminierung der minderwertigen Enden und freien Primer-Adapter, Clusterlängen von 14-31 nt, mit einem mittleren Hauptpeak bei 20 nt. Die bioinformatische PAR-CLIP Datenanalyse erfolgte durch Andreas Klötgen (UK Düsseldorf).

Zur Analyse der RNA Fragmente, welche an NF-YA gebunden vorlagen, wurden die Daten im Anschluss gegen das humane Referenz Genom hg19 aligniert. Als Anhaltspunkt für die Identifizierung der RNA-Interaktionssequenz dienten die durch das 4-Thio-Uridin, bei der cDNA-Synthese, eingeführten T → C Mutationen (Abbildung 10). Die bioinformatischen Analysen der im PAR-CLIP gefundenen RNA-Sequenzen beziehen sich nachfolgend auf die genomisch annotierten Sequenzen. Die Untersuchung des Bindemotivs beider Replikate ergab die Sequenzabfolge C(T/A)G(A/T), welches in 90% der Cluster vertreten war. Des Weiteren konnte dieses Konsensus-Motiv auch in der *PANDAR*-Clustersequenz mit CTGT wiedergefunden werden (Abbildung 20A, D). Darüber hinaus wurden die Sequenzen, die nicht gegen das Genom oder Transkriptom aligniert haben, gegen die Datenbank Lncipedia.org aligniert und es zeigte sich das aus Experiment 1 und 2 überlagerte Bindemotiv TCTG (Abbildung 20B, C). Dieses Bindemotiv konnte ebenfalls in der *PANDAR* Clustersequenz gefunden werden und zeigt, dass die lncRNA *PANDAR* sowohl das allgemeine Bindemotiv als auch das der lncRNAs beinhaltet (Abbildung 20D). Insgesamt unterscheiden sich diese Bindemotive nur in einer Position, sodass ein Grundmotiv von CTG vorhanden ist.

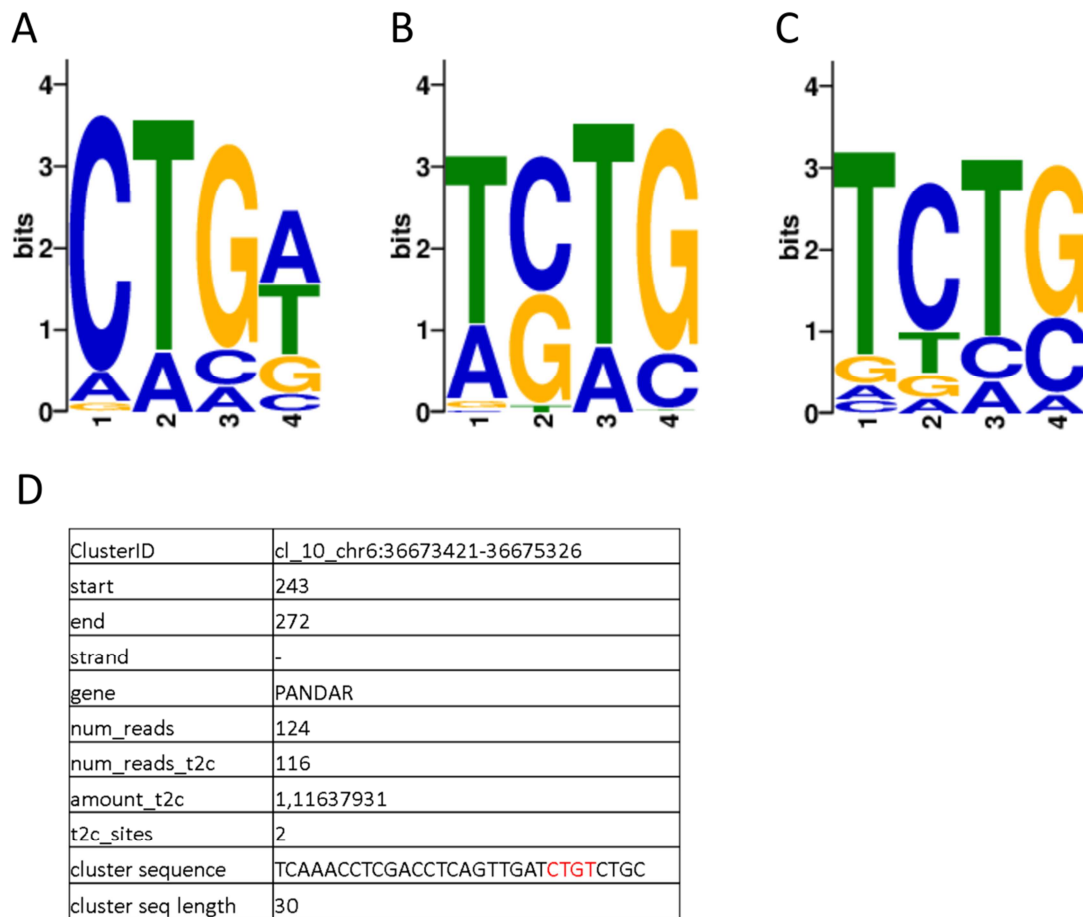


Abbildung 20: NF-YA Bindemotive

(A) Das allgemeine Bindemotiv C(T/A)G(A/T) aus Replikat 1+2 (2/3) kann in 90% der Cluster identifiziert werden. (B,C) Die Analyse der nicht im Genom und Transkriptom alignierten Proben gegen die Lncipedia Datenbank ergibt das Bindemotiv (T/A)(C/G)(T/A)(G/C) für das Replikat1 (B) und T(C/T)(T/C)(G/C) für das Replikat2 (2/3) (C). (D) Sowohl das allgemeine als auch das der mittels Lncipedia Datenbank ermittelte NF-YA Bindemotiv kann in der *PANDAR* RNA Sequenz gefunden werden. Die bioinformatische PAR-CLIP Datenanalyse erfolgte durch Andreas Klötgen (UK Düsseldorf).

Basierend auf den Ergebnissen des erhaltenen NF-YA Bindemotivs C(T/A)G(A/T), wurden Mutationsstudien des Bindemotivs durchgeführt, um dieses zu überprüfen. Hierfür wurde die NF-YA bindende Sequenz innerhalb des 30 nt langen wildtypischen *PANDAR* RNA Fragments (1434-1463) mutiert und für die nachfolgende Überprüfung der Bindung *in vitro* transkribiert (Tabelle 40). Das wildtypische Fragment enthielt neben dem rot markierten CTGT Bindemotiv ein weiteres potenzielles Bindemotiv (CAGT, grau markiert). Das CTGT Motiv wurde in der Mutante1 und Mutante1_2 mutiert. Zusätzlich wurde bei der Mutante 1_2 das potenzielle Bindemotiv CAGT mutiert. Die Mutante2 stellt ein anderes 30 nt langes Fragment (1201-1230 nt) der wildtypischen Vollängen *PANDAR* RNA dar. Als Kontrollen dienten zwei 30 nt lange RNA Fragmente, die nicht von *PANDAR* abgeleitet sind.

Tabelle 40: Mutanten des NF-YA Bindemotivs

WT	TCAAACCTCGACCTCAGTTGATCTGTCTGC
Mut1	TCAAACCTCGACCTCAGTTGATACCGCTGC
Mut2	CTCAGCTTTCCAGCTATCAATTTATCAAGA
Mut1_2	TCAAACCTCGACCTCAGGTGATACCGCTGC
Kon1	ATGGTGAAGGACGGGTCCAGGTGTGGCTGC
Kon2	CATCTACACCTCACGAGGGCACTAGGAGCA

Die Bindungsstudien mittels REMSA wurden mit *in vitro* transkribierter RNA und aufgereinigten NF-Y Fragmenten (NF-YA₂₃₃₋₃₀₃, NF-YB₅₁₋₁₄₃, NF-YC₂₇₋₁₂₀) durchgeführt (Abbildung 21). Das 30 nt lange wildtypische RNA Fragment mit NF-YA Bindemotiv zeigte, wie auch die anderen *PANDAR* RNA Fragmente (Mut1, Mut2 und Mut1_2), eine Interaktion mit NF-YA. Auch die 30 nt langen Kontroll-RNAs wiesen eine Bindung zu dem NF-YA Fragment auf. Darüber hinaus wurde für den Wildtyp, Mutante1 und Mutante2 die Interaktion mit NF-YB/YC und im trimeren NF-Y Komplex überprüft. Hierbei zeigte sich eine Interaktion der genannten RNA Fragmente mit dem NF-Y Trimer und eine leichte Interaktion mit NF-YB/YC. Diese Daten zeigen, dass in dieser Mutationsanalyse mit den gewählten und mutierten 30 nt langen RNA Fragmenten keine Sequenz-abhängige Bindung des heterolog exprimierten NF-YA Fragments stattfindet.

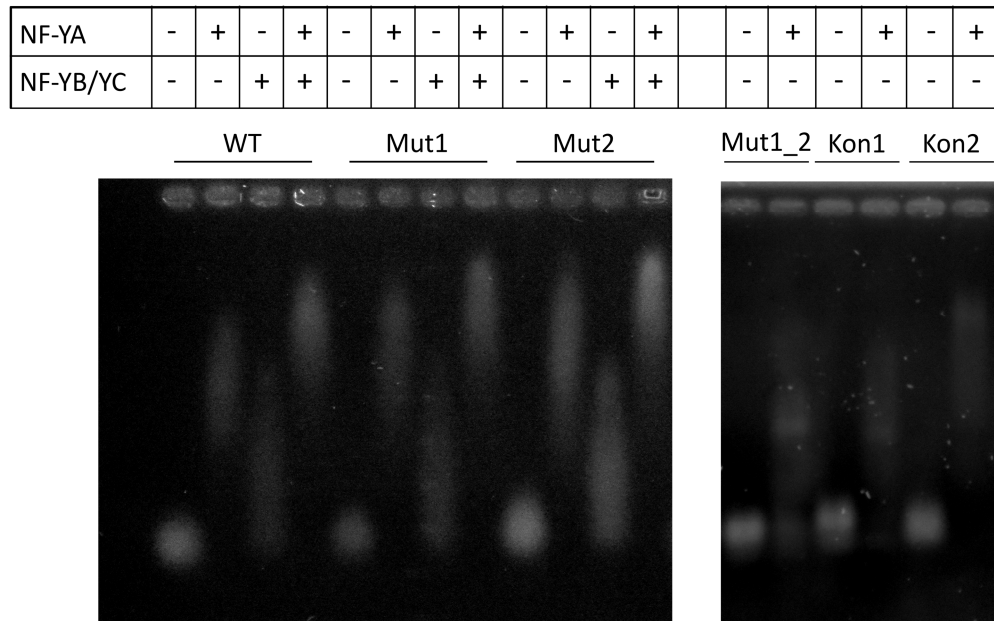


Abbildung 21: Interaktionsstudie des NF-YA wildtypischen und mutierten Bindemotivs an *PANDAR* RNA

Der mit Ethidiumbromid-gefärbte REMSA zeigt die Interaktion durch die Laufweitenverschiebung der wildtypischen (WT) und mutierten (Mut) Bindemotive der *PANDAR* RNA-Fragmente mit NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ und mit dem NF-Y trimeren Komplex (NF-YA₂₃₃₋₃₀₃, NF-YB₅₁₋₁₄₃, NF-YC₂₇₋₁₂₀). Auch die Kontrollen (Kon) interagieren Sequenz-unabhängig mit NF-YA₂₃₃₋₃₀₃. Verhältnis: 6 μ M RNA, 9 μ M Protein. Das Design der Konstrukte und die Methodenetablierung erfolgten durch mich und die experimentelle Durchführung durch Hannah Cibis unter meiner Betreuung.

4.3 Identifizierung der *PANDAR*-interagierenden Proteine mittels PNA-SILAC

Um neue *PANDAR*-bindende Proteine zu identifizieren wurde ein PNA-basiertes SILAC Experiment mit nachfolgender massenspektrometrischen Analyse der *PANDAR*-gebundenen Proteinkandidaten durchgeführt, wobei diese Kandidaten nachfolgend validiert wurden. Um die Interaktion der lncRNA *PANDAR* mit einem dieser Kandidaten im biologischen Kontext zu prüfen, wurden weitere Charakterisierungen durchgeführt.

4.3.1 Herstellung und Bindungsaffinität von *PANDAR*-PNAs

Für die Markierung der lncRNA *PANDAR* wurden *PANDAR*-spezifische Peptide Nucleic Acids (PNAs) als Sonden hergestellt und deren Affinität gegenüber der *PANDAR* RNA getestet. PNAs sind artifizielle synthetisch-hergestellte Polymere, welche an DNA und RNA binden und aus einem Peptidrückgrat bestehen. Für das Design von *PANDAR*-spezifischen PNAs wurden 15 nt lange Sequenzen der *PANDAR* RNA gewählt, welche einzigartig im Transkriptom vorkommen. Die Binderegionen der PNA an die *PANDAR* RNA sind in der Sekundärstruktur-Vorhersage dargestellt (Abbildung 22). Die PNA1 bindet komplementär an

eine Region nahe dem 3'-Ende der RNA, welche durch eine große freie Loop-Region gekennzeichnet ist. Hingegen zeigt sich für PNA2 eine Bindung, nahe dem 5'-Ende, an eine Region, welche bereits starke intramolekulare Interaktionen aufweist. Die PNA3 bindet einen Sequenzbereich der teils als frei zugänglicher Loop und teils als Duplexstruktur vorliegt. Der Sequenzbereich von PNA3 wurde bereits in siRNA Knockdown Experimente eingesetzt und zeigte dort das effizienteste Knockdown-Potenzial (Abbildung 13C). Dadurch wird diese Region für die folgenden Experimente als zugänglich für die PNA vermutet.

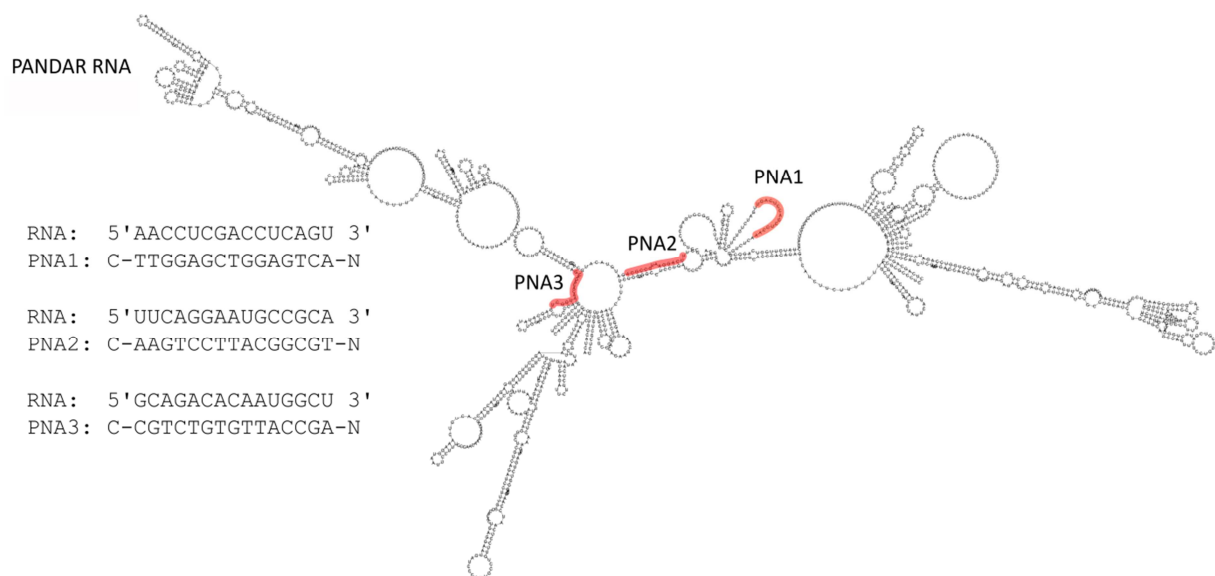


Abbildung 22: Vorhersage der *PANDAR* Sekundärstruktur mittels mfold

Dargestellt sind die zentroidale Sekundärstruktur der *PANDAR* RNA und die Interaktionsstellen der gegen *PANDAR* gerichteten PNA1, PNA2 und PNA3. Basierend auf der *PANDAR*-Sekundärvorhersage bindet die PNA1 an eine Loop-Region nahe des 3'-Endes, PNA2 an eine nahe dem 5'-Ende gelegene Region, welche starke intramolekulare Interaktionen aufweist und PNA3 interagiert mit einer teils freien Loop-Region.

Die Herstellung der PNAs erfolgte mittels Festphasen-Synthese an NovaSynTGR Harz (Methoden-Kapitel 3.2.3.1, Abbildung 9). Nach erfolgreicher Synthese der PNAs, deren Kupplung an den Abstandshalter PEG und Biotin (Affinitäts-Tag) bzw. FITC (Fluorophor) wurden die PNAs vollabgespalten und mittels HPLC aufgereinigt (Anhang Abbildung 37, Abbildung 38). Exemplarisch dargestellt ist die HPLC-MS-Analyse der aufgereinigten Biotin-gekuppelten PNA1 (Abbildung 23). Das Absorptionsspektrum bei 260 nm zeigt einen sauberen Peak nach der Aufreinigung bei einer Retentionszeit von 8 min (Abbildung 23A). Diesem Peak zugehörig sind die zwei deutlichen Peaks im MS-Spektrum, welche die Masse des mehrfach geladenen PNA-Produkts darstellen (Abbildung 23B). Dabei handelt es sich zum einen um das vierfach geladene Ion mit einer Masse von 1169 und zum anderen um das dreifach geladene Ion mit einer Masse von 1559.

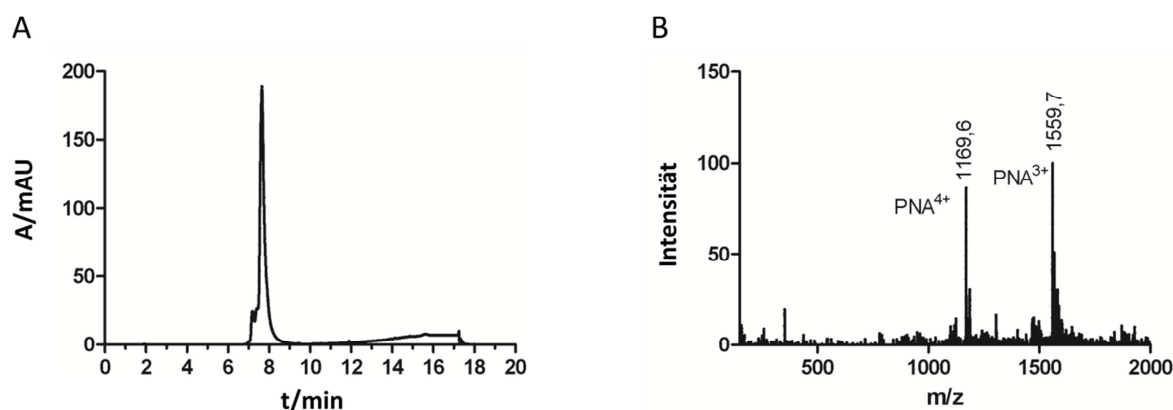


Abbildung 23: HPLC-MS-Analyse der aufgereinigten Biotin-PEG5-PNA1

Dargestellt ist die finale HPLC-MS Analyse der gegen *PANDAR* RNA gerichteten aufgereinigten Biotin-PEG5-PNA1. (A) Das Absorptionsspektrum bei 260 nm zeigt bei einer Retentionszeit von 8 min die aufgereinigte Biotin-PEG5-PNA1, welche anhand der zugehörigen Massen PNA^{4+} 1169 und PNA^{5+} 1559 der mehrfach geladenen Ionen identifiziert werden können (B).

Nach der erfolgreichen Synthese der *PANDAR* spezifischen PNAs sollten diese hinsichtlich ihrer Bindung an die lncRNA *PANDAR* überprüft werden. Zur Analyse der Bindungsaffinität der PNAs an *PANDAR* RNA wurde ein Fluoreszenz Polarisation (FP) Assay durchgeführt. Hierfür wurde *in vitro* transkribierte *PANDAR* RNA gegen eine konstante Konzentration von 10 nM FITC-PNA titriert und die Änderung der Fluoreszenz Polarisation gemessen. Hierbei wird die FITC-PNA mit polarisiertem Licht angeregt. Im ungebundenen Zustand emittiert die FITC-PNA, aufgrund ihrer relativ schnellen Bewegung in Lösung, depolarisiertes Licht. Liegt die FITC-PNA jedoch gebunden an der RNA vor, so bewegt sie sich aufgrund der größeren Masse langsamer, wodurch das Licht polarisiert emittiert wird. Die Analyse der Bindeaffinität von FITC-PNA an *PANDAR* RNA ergab Affinitäten im nM Bereich (Abbildung 24A). Die beste Affinität zeigte PNA1 mit einer Dissoziationskonstante (K_d) von 1,8 nM, gefolgt von der PNA3 bzw. PNA2 mit 55 nM bzw. 68 nM.

Des Weiteren wurden die gegen *PANDAR* gerichteten Biotin-PNAs eingesetzt, um die Anreicherung von *PANDAR* aus einem Pool total isolierter RNA zu untersuchen. Hierfür wurde die totale RNA aus stabilen *PANDAR*-U2OS Zellen isoliert und für den Streptavidin-Pull Down mit Biotin-PNAs bzw. ohne PNA (Kontrolle) eingesetzt. Die Analyse der qPCR ergab eine Anreicherung der *PANDAR* RNA für alle drei Biotin-PNAs (Abbildung 24B). Im Vergleich zur Kontrolle wurde *PANDAR* durch PNA1 ~10-fach, PNA2 ~7-fach und PNA3 ~14-fach angereichert.

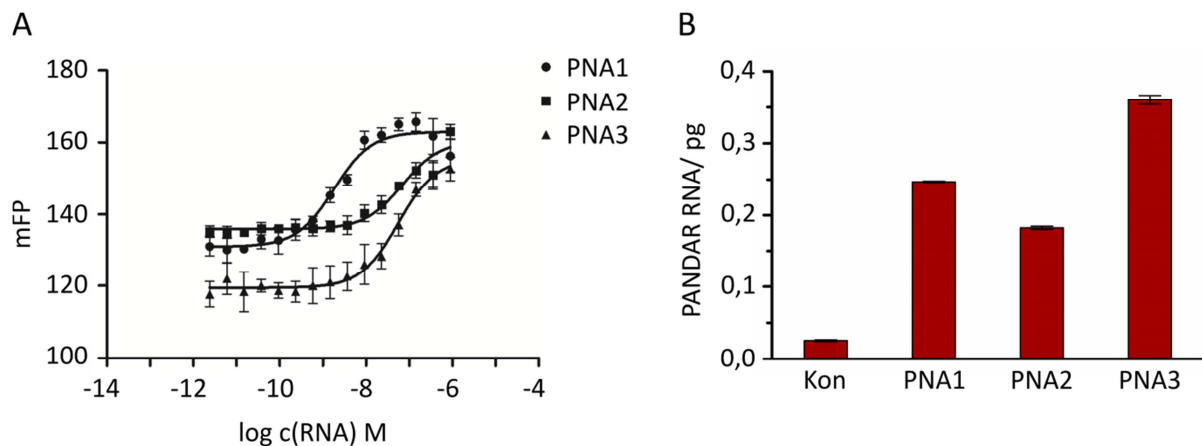


Abbildung 24: Affinität von gegen *PANDAR* gerichteten PNAs an *PANDAR* lncRNA

Die Untersuchung der Affinität der gegen *PANDAR* RNA gerichteten PNAs gegenüber der *PANDAR* RNA ist dargestellt. (A) Gezeigt ist die Titration der *in vitro* transkribierten *PANDAR* RNA gegen eine konstante Konzentration von FITC-PNA (10 nM). Die Analyse der PNA-*PANDAR* Bindeaffinität mittels Fluoreszenz Polarisation zeigt die beste Bindung mit PNA1 (1,8 nM), gefolgt von PNA3: 55 nm und PNA2: 68 nm. (B) Dargestellt ist die Auswertung des Biotin-Pull Downs, mit gegen *PANDAR* gerichteter Biotin-PNA, aus total isolierter RNA der stabilen *PANDAR*-U2OS Zelllinie. Die Analyse der qPCR zeigt, dass die Biotin-PNA1 (~10-fach), 2 (~7-fach) und 3 (~14-fach) die lncRNA *PANDAR* aus einem Pool totaler isolierter RNA anreichern können, im Vergleich zur Kontrolle (Kon). Für die Bestimmung der mittels PNA-gebundenen *PANDAR* Menge wurde ein *PANDAR* Standard aufgetragen. Kon= Kontrolle ohne PNA. Dargestellt sind repräsentative Daten.

4.3.2 PNA-SILAC-MS Analyse und Validierung der *PANDAR*-bindenden Proteine

Um der Frage nachzugehen, ob die lncRNA *PANDAR* mit weiteren Proteinen interagiert, wurde im Folgenden ein PNA-basierter *PANDAR* Pull Down mit anschließender massenspektrometrischen Analyse durchgeführt, um neue Interaktionspartner zu identifizieren (Methoden-Kapitel 3.2.4). Hierfür wurden die wildtypischen U2OS Zellen im Rahmen des stable isotope labeling in cell culture (SILAC) für 5 Passagen in Medium mit leichtem bzw. schwerem Arginin und Lysin kultiviert. Nach der Überprüfung der vollständigen Inkorporationsrate der Aminosäuren in die Proteine, wurden diese SILAC-kultivierten Zellen für die Identifizierung der *PANDAR*-interagierenden Proteine mittels PNA-basiertem SILAC verwendet (Abbildung 25). Da die PNA1 und PNA3 gegenüber der *PANDAR* RNA eine gute Affinität gezeigt haben (Abbildung 24), wurden nachfolgend die Biotin-PNA1 bzw. Biotin-PNA3 verwendet.

Für den Pull Down von *PANDAR*-interagierenden Proteinen wurde *in vitro* transkribierte *PANDAR* RNA mittels Biotin-PNA an Streptavidin gekoppelten magnetischen Beads gebunden. Im Rahmen des forward Experiments (Abbildung 25 links) wurde der PNA-*PANDAR*-Bead Komplex mit dem Zelllysat von schweren (Arg10/Lys8) SILAC-kultivierten U2OS Zellen inkubiert und die *PANDAR*-interagierenden Proteine an den Beads angereichert.

Als vergleichende Kontrolle wurden die leichten (Arg0/Lys0) SILAC-kultivierten U2OS Zellen mit Beads ohne PNA und *PANDAR* RNA inkubiert und für den Pull Down verwendet. Nach dem tryptischen Verdau, wurden die Proben massenspektrometrisch analysiert und das Verhältnis der schweren (durch *PANDAR* angereichert) zu leichten (Kontrolle) Peptide ermittelt (MS-Messung und Analyse durch Dr. Tanja Bange, MPI Dortmund). Für eine aussagekräftige Validierung wurden die Experimente zusätzlich in reverse (Abbildung 25 rechts) durchgeführt, wobei hier der PNA-*PANDAR*-Bead-Komplex mit den leichten SILAC-kultivierten Zellen inkubiert wurde und die Kontrolle mit den schweren SILAC-kultivierten Zellen. Nachfolgend wurde hier das Verhältnis von leichten zu schweren Peptiden ermittelt. Die mittels forward und reverse erhaltenen Daten konnten im Anschluss gegeneinander aufgetragen werden.

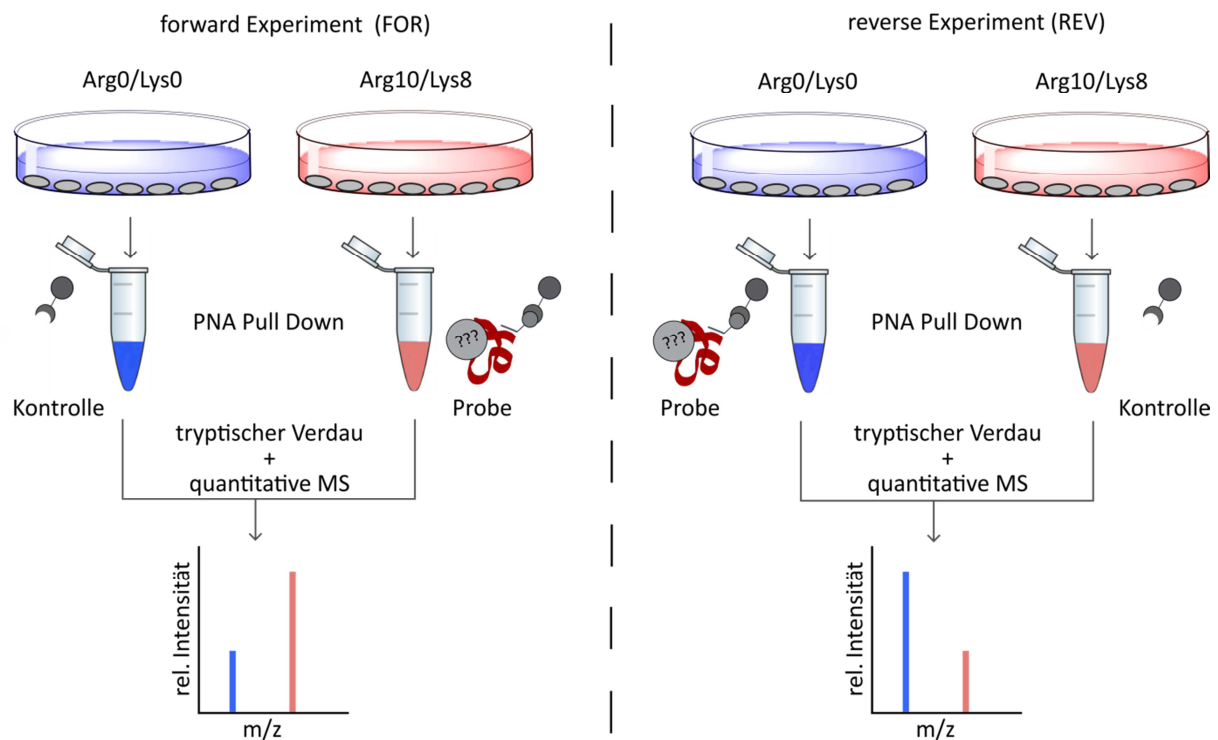


Abbildung 25: Experimenteller Workflow des PNA-SILAC-MS Experiments

Der Komplex aus Streptavidin, Biotin-PNA und *in vitro* transkribierter *PANDAR* RNA oder Streptavidin Beads ohne PNA und RNA wird mit den SILAC-kultivierten Zelllysaten inkubiert. *PANDAR*-bindende Proteine, in den Proben mit zusätzlicher *PANDAR in vitro* RNA, werden angereichert. Die quantitative massenspektrometrische (MS) Analyse erfolgt nach dem tryptischen Verdau. Durchführung der Experimente erfolgt in forward (FOR; links) und reverse (REV; rechts) um spezifische Interaktoren zu identifizieren.

Bei der Datenanalyse der quantitativen massenspektrometrischen Ergebnisse wurde das Verhältnis der schweren/leichten (heavy/light, H/L) Peptide von Probe und Kontrolle im log2 berechnet. Für die Auftragung im Scatterplot wurden die Werte der reversen Analyse

invertiert ($1/(H/L)$) (Abbildung 26A, B). Der Schwellenwert für die Bestimmung potenzieller Kandidaten wurde auf $\log_2 \geq 2$ gesetzt. Insgesamt ergaben sich ohne Filtersettings für forward PNA1: 411 Proteine, reverse PNA1: 372 Proteine (Abbildung 26A), forward PNA3: 476 Proteine und reverse PNA3: 458 Proteine (Abbildung 26B). Nach dem Filtern und Gegenüberstellen der forward und reverse Datensätze von PNA1 und PNA3 ergaben sich 22 Hits für potenzielle *PANDAR*-interagierende Proteinkandidaten (Abbildung 26C).

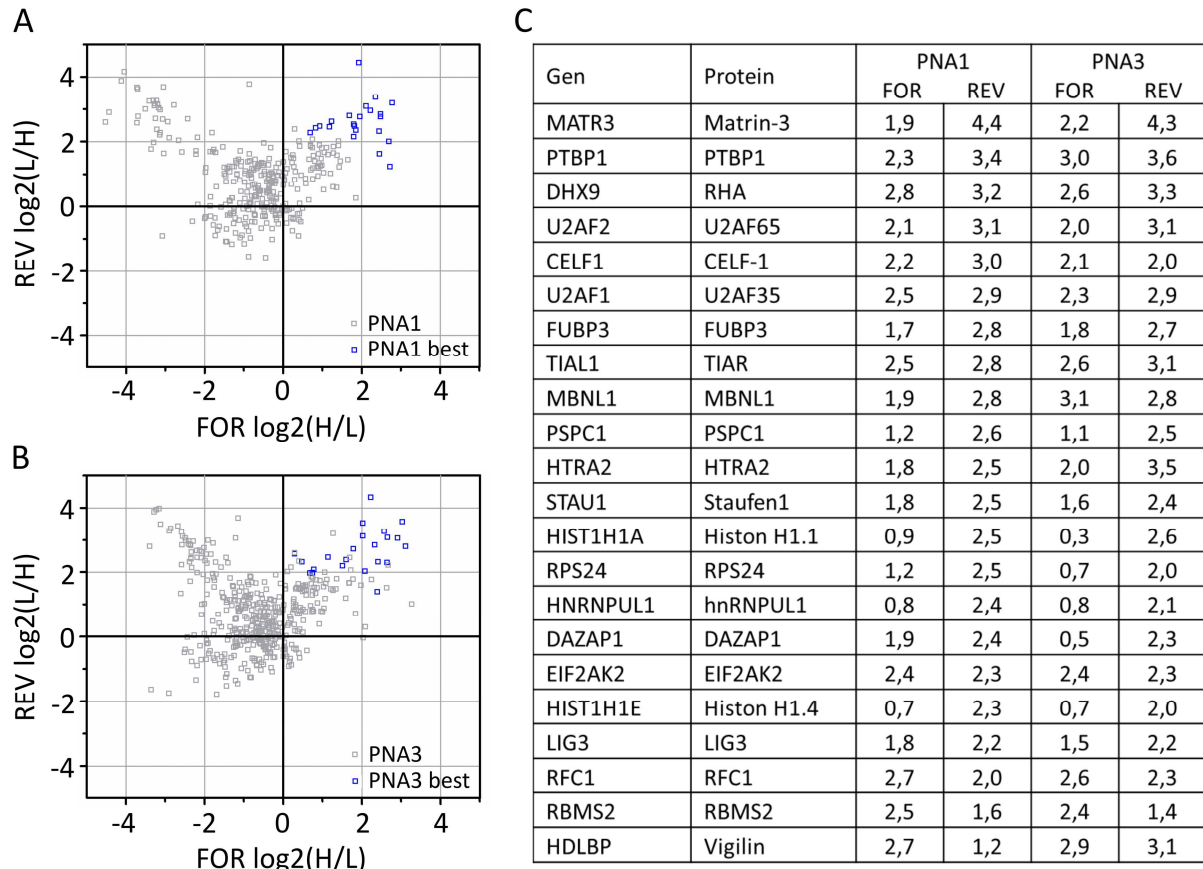


Abbildung 26: SILAC Ergebnisse des PNA-*PANDAR* RNA-basierten Pull Downs

Dargestellt sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse des PNA-*PANDAR* RNA-basierten Biotin-Pull-Downs aus SILAC-kultivierten wildtypischen U2OS-Zellen. Die analysierten *PANDAR*-bindenden Kandidaten für Biotin-PNA1 (A) und Biotin-PNA3 (B) sind im \log_2 für forward (FOR, H/L) und reverse (REV, $1/(H/L)$) geplottet. Die besten Interaktionspartner, welche durch beide Kandidaten angereichert wurden sind in blau dargestellt und tabellarisch (C) mit den zugehörigen Werten aufgeführt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte durch Dr. Tanja Bange (MPI Dortmund).

Für den weiteren Validierungsprozess wurden die potenziellen Kandidaten, ausgenommen Vigilin und Replication Factor C subunit A (RFC1), in eGFP-getaggte Plasmide für die transiente Transfektion kloniert. Da bereits in der Literatur eine *PANDAR*-Interaktion mit NF-YA und dem Scaffold attachment factor A (SAFA, Synonym: hnRNPU) beschrieben wurde, wurden diese beiden Kandidaten ebenfalls in den Validierungsprozess miteinbezogen und

kloniert. Nach 24-stündiger transienter Transfektion in stabile *PANDAR*-U2OS Zellen wurde die Expression der eGFP-getaggtten Proteinkandidaten und des eGFP-Kontrollplasmids mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht und für den GFP-Pull Down eingesetzt. Hierbei zeigten die Kandidaten DNA Ligase 3 (LIG3), Serine protease HTRA2, mitochondrial (HTRA2), Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase (EIF2AK2) und Histon H1.4 eine entweder nicht effiziente Transfektion oder auch schlechte Löslichkeit im Zelllysatsat und wurden von der weiteren Validierung ausgeschlossen. Die Pull Down Effizienzen der übrigen gut löslichen Kandidaten wurde mit Hilfe von GFP-Western Blots untersucht (Anhang Abbildung 35). Des Weiteren wurde die Menge der gebundenen *PANDAR* RNA in der jeweiligen gebunden Probe mittels quantitativer Real Time PCR analysiert (Abbildung 27). Die *PANDAR* RNA Menge der jeweiligen Proben wurde mit Hilfe eines *PANDAR* Templat-Standards berechnet und auf die *PANDAR* RNA Menge der eGFP-Kontrolle (=1) normiert. Die statistische Berechnung (Kapitel 3.2.4.1.1) der mit *PANDAR* RNA angereicherten Proben ergab einen Median von 177 und eine mittlere absolute Abweichung (MAD) von 168. Der nachfolgend ermittelte Z-Score von 3 diente als Schwellenwert für die besten Kandidaten. Da die *PANDAR* RNA Menge bei hnRNPUL1 mit einem Z-Score von 2,8 nur knapp unter dem analysierten Schwellenwert lag, wurde dieses Protein für den weiteren Validierungsprozess mit eingeschlossen. Somit handelt es sich bei den *PANDAR*-Interaktionskandidaten um die unter anderem im RNA Spleißen involvierten Proteine SAFA (hnRNPU), Polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1; hnRNPI), Spleißfaktor U2AF 65kDa Untereinheit (U2AF65, Gen: *U2AF2*) und heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein (hnRNPUL1).

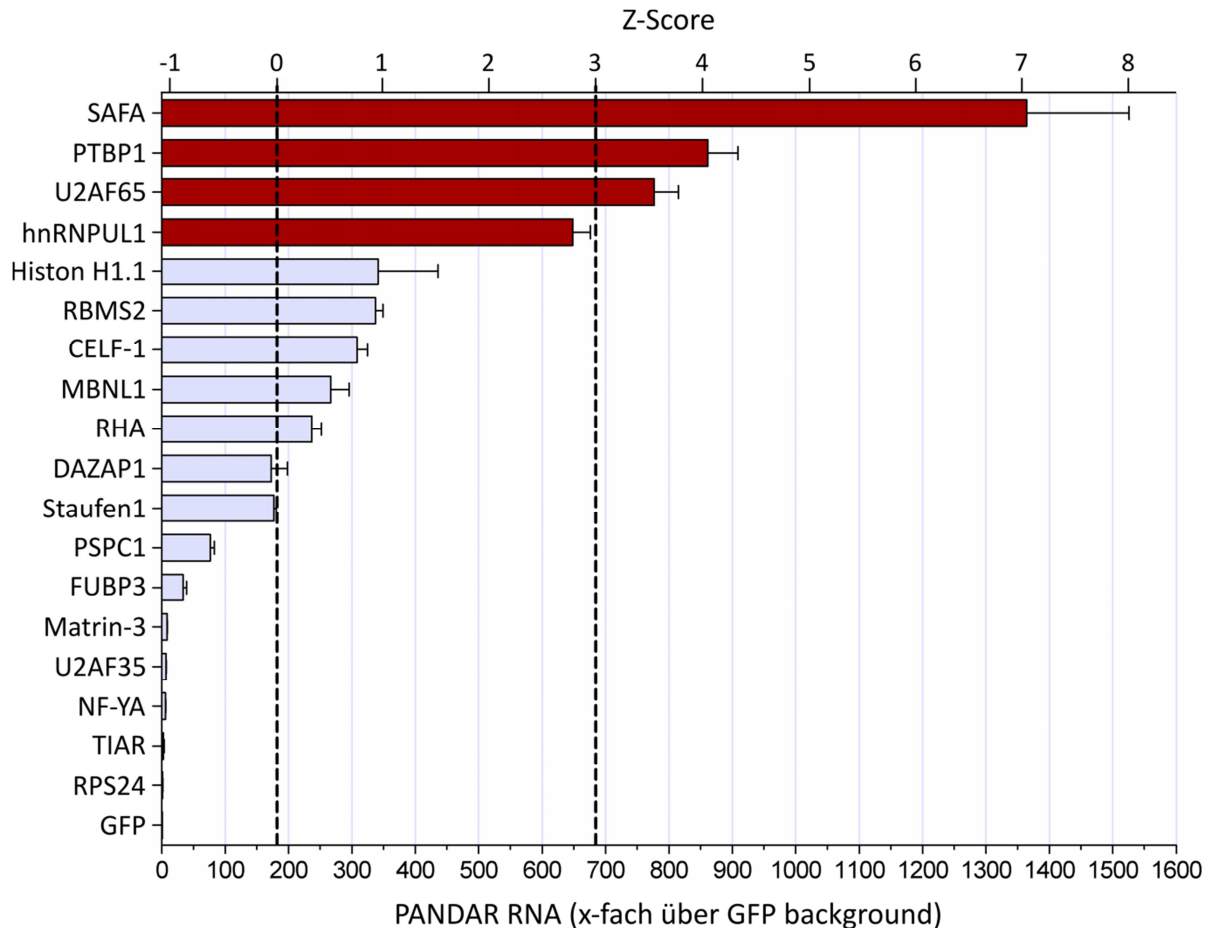


Abbildung 27: Analyse von gebundener *PANDAR* RNA an SILAC Proteinkandidaten

Dargestellt sind die Ergebnisse des GFP-Pull Downs der *PANDAR*-bindenden Proteinkandidaten. Stabile *PANDAR*-U2OS Zellen wurden transient für 24 h mit den eGFP-Plasmiden der jeweiligen Proteinkandidaten transfiziert und für den GFP-Pull Down eingesetzt. Die mittels qPCR ermittelte gebundene *PANDAR* RNA Menge der eGFP-Fusionsproteine wurde in die x-fache Anreicherung gegenüber der eGFP-Kontrolle (=1) konvertiert. Die statistische Analyse der Daten ergab einen Median von 177 (Z-Score: 0) und eine mittlere absolute Abweichung (MAD) von 168. Der Z-Score von 3 wurde als Schwellenwert für bindende Kandidaten (rot) gesetzt, wobei hnRNPUL1 für weitere Validierungsprozesse einbezogen wurde. Für Berechnung der *PANDAR* RNA Menge diente ein *PANDAR* Templat-Standard.

Die Bindung der zuvor validierten *PANDAR*-bindenden Proteinkandidaten SAFA, PTBP1, U2AF65 und hnRNPUL1 wurde im Anschluss auf endogenem Proteinlevel untersucht. Als Kontrolle diente das RNA-binding motif, single-stranded-interacting Protein (RBMS2), welches in der Validierung der SILAC Ergebnisse einen unter dem Schwellenwert (Z-Score 3) liegenden Wert ergab. Hierfür wurde *in vitro* transkribierte biotinylierte *PANDAR* RNA an Streptavidin-magnetische Beads immobilisiert und mit Zelllysate von wildtypischen U2OS Zellen inkubiert. Die Bindung der Proteinkandidaten wurde mit Hilfe von Western Blots und Proteinkandidaten-spezifischen Antikörpern untersucht (Abbildung 28A). Die Kandidaten hnRNPUL1, SAFA, PTBP1 und U2AF65 befanden sich im löslichen Überstand (Input) und wurden von der *PANDAR* RNA gebunden (B: bound). Der Durchfluss (FT:

flowthrough) zeigt zudem, dass das System mit den jeweiligen Proteinen gesättigt war. Die RBMS2 Kontrolle zeigte keine Bindung an Biotin-*PANDAR* RNA. Eine unspezifische Bindung der Proteine an magnetische Beads konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 28B).

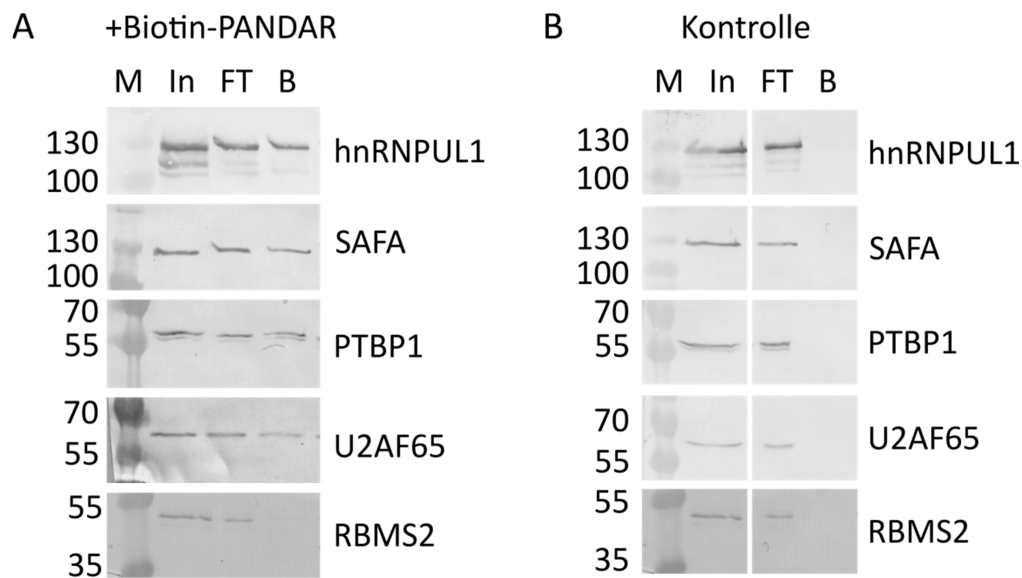


Abbildung 28: Western Blot Analyse der gebundenen Proteine an Biotin-*PANDAR* RNA

Dargestellt ist die Western Blot Analyse des Biotin-*PANDAR* Pull Downs aus wildtypischen U2OS Zellen. (A) Die mittels *PANDAR*-Pull Down angereicherten Proteine hnRNPUL1, SAFA, PTBP1 und U2AF65 können im Input, Durchfluss und in den gebundenen Fraktionen mittels proteinspezifischen Antikörpern detektiert werden. Die RBMS2 Kontrolle zeigt keine Bindung an Biotin-*PANDAR* RNA. (B) Die Kontrolle ohne Biotin-*PANDAR* RNA zeigt keine unspezifische Bindung der untersuchten Proteine an die Streptavidin-magnetischen Beads. M: Marker [kDa]; In: Input; FT: Durchfluss (Flowthrough); B: Bound

Die zuvor erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine Interaktion der Proteine hnRNPUL1, SAFA, PTBP1 und U2AF65 mit der lncRNA *PANDAR* hin. Da diese Proteine in ähnlichen Prozessen wie dem RNA-Spleißen involviert sind, wurde nachfolgend untersucht, ob diese Proteine in einem Protein-Protein-Komplex vorliegen, welcher RNA-abhängig oder -unabhängig vermittelt wird. Hierfür wurden die eGFP-modifizierte Kandidaten hnRNPUL1, SAFA, PTBP1 und U2AF65 einzeln in wildtypische U2OS Zellen transient transfiziert, mittels GFP-Immunpräzipitation angereichert, mit bzw. ohne RNase behandelt und hinsichtlich der Bindung an die anderen Proteinkandidaten analysiert (Abbildung 29).

Die Untersuchung der GFP-Immunpräzipitation von eGFP-SAFA zeigte eine Interaktion zwischen eGFP-SAFA und dem endogenen SAFA (Abbildung 29A). Des Weiteren konnte eine leichte Bindung von hnRNPUL1 in dem unbehandelten, jedoch nicht im RNase-behandelten Ansatz beobachtet werden. Für U2AF65 und PTBP1 konnte keine Interaktion mit

eGFP-SAFA detektiert werden. Die Immunopräzipitation von eGFP-hnRNPUL1 zeigte eine starke Interaktion mit dem endogenen hnRNPUL1, sowohl in der unbehandelten, als auch in der RNase-behandelten Probe (Abbildung 29B). Jedoch war keine Interaktion mit SAFA zu beobachten. Auch U2AF65 und PTBP1 konnten nicht in den eGFP-hnRNPUL1 immunpräzipitierten Proben detektiert werden. Die Analyse der GFP-Immunopräzipitation von eGFP-PTBP1 zeigte eine Komplexbildung von PTBP1 und hnRNPUL1, wobei die Behandlung mit RNase zum Verlust dieser Interaktion führte (Abbildung 29C). Des Weiteren zeigte sich eine Interaktion zwischen eGFP-PTBP1 mit endogenem PTBP1 in den gebundenen Fraktionen der unbehandelten und RNase-behandelten Proben. Hinsichtlich SAFA und U2AF65 konnte keine Bindung in den jeweiligen gebundenen Fraktionen beobachtet werden. Die Analyse der an eGFP-U2AF65 gebundenen Proteine zeigte keine Interaktion mit den anderen *PANDAR*-bindenden Proteinkandidaten PTBP1, SAFA und hnRNPUL1 (Abbildung 29D). Die Untersuchung der eGFP-Kontrolle zeigte keine Interaktion mit den untersuchten Kandidaten (Anhang Abbildung 32).

4.3.3 *PANDAR* beeinträchtigt das PTBP1-vermittelte *BCL-XS* Spleißen

In dieser Arbeit konnte PTBP1 als ein Interaktionspartner der lncRNA *PANDAR* identifiziert und bestätigt werden. PTBP1 ist am alternativen Spleißen der *BCL-X* prä-mRNA beteiligt und initiiert das *BCL-XS* mRNA Spleißprodukt der pro-apoptotischen Variante des Apoptoseregulators Bcl-X (Bielli et al., 2014a).

Um zu überprüfen, welchen zellulären Effekt die Interaktion von *PANDAR* und PTBP1 hat, wurde das PTBP1-vermittelte Spleißen der *BCL-XS* Variante untersucht. Hierfür wurden wildtypische U2OS Zellen für 48 h transient mit einem *PANDAR* und/ oder eGFP-PTBP1 Plasmid transfiziert und das *PANDAR* und *BCL-XS* RNA Level mittels quantitativer Real Time PCR bestimmt. Normiert wurde hierbei auf das eGFP-Kontrollplasmid. Die Analyse der RNA-Level konnte zeigen, dass die Überexpression von *PANDAR* in den U2OS Zellen zu einem reduzierten *BCL-XS* mRNA Level führt, im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 30A). Diese Reduktion der *BCL-XS* mRNA konnte jedoch durch die gleichzeitige Überexpression von *PANDAR* und PTBP1 wieder auf das ursprüngliche Niveau gebracht werden (Abbildung 30B).

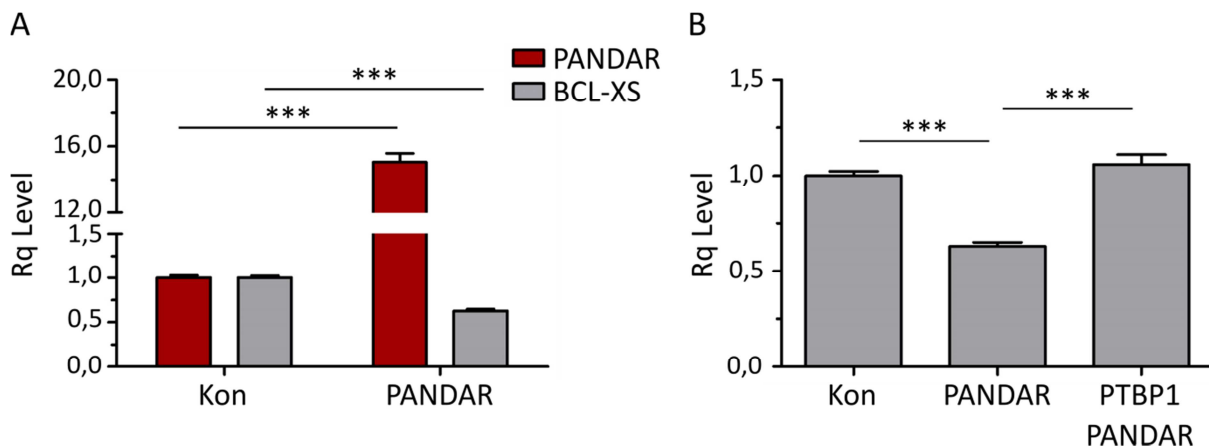


Abbildung 30: *PANDAR* RNA reguliert *BCL-XS*

Die Untersuchung der *PANDAR*-abhängigen *BCL-XS* Regulation ist dargestellt. Wildtypische U2OS-Zellen wurden für 48 h transient mit einem Kontrollplasmid, *PANDAR*-Plasmid und/oder eGFP-PTBP1-Plasmid transfiziert. (A) Die Analyse der qPCR zeigt, dass die Überexpression der lncRNA *PANDAR* (rot) zu einer Reduktion des *BCL-XS* (grau) Spleiß-Transkripts führt. (B) Das durch *PANDAR*-reduzierte *BCL-XS* Level kann durch eine gleichzeitige Überexpression von PTBP1 wieder normalisiert werden. Die Projektplanung und Vorarbeit erfolgte durch mich und die finale experimentelle Durchführung durch Hannah Cibis unter meiner Betreuung. Kon= Kontrollplasmid, Rq= relative Quantität ((*BCL-XS*/*GAPDH*) bzw. (*PANDAR*/*GAPDH*)) n=3; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

5. Diskussion

5.1 Analyse der endogenen und induzierten *PANDAR* Expression in humanen Zellen

Die Zellantwort auf zellulären Stress, wie DNA Schaden, ist ein streng kontrollierter Prozess basierend auf pro-seneszenten und pro-apoptotischen Signalwegen. Der durch Doxorubicin-Behandlung induzierte DNA Schaden kann je nach Stress- und aktiviertem p53-Level zu unterschiedlichen Zellantworten führen. Hierbei spielen unter anderem die Stabilisierung des tetrameren Komplexes, posttranslationalen Modifikationen und die kooperative Zusammenlagerung der DNA Bindedomänen von p53 eine wichtige Rolle (Childs et al., 2014; Vousden and Lane, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Titrationsreihe unterschiedlicher Doxorubicin-Konzentrationen für 24 h an einem Panel humaner Zelllinien durchgeführt, um den Effekt hinsichtlich des Zellüberlebens zu überprüfen (Abbildung 11). Hierbei zeigten sich konzentrationsabhängige Überlebensraten bzw. Proliferationshemmungen der jeweiligen Zelllinien, wobei mit steigender Konzentration eine reduzierte Zellzahl beobachtet werden konnten. Dieser konzentrationsabhängige Effekt kann auf die verschiedenen involvierten Signalwege, die unter anderem zu Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose führen, zurückgeführt werden. So konnte beispielsweise in MCF7 Brustkarzinomzellen gezeigt werden, dass geringe Konzentration von Doxorubicin zu Seneszenz führen, während hohe Konzentrationen die Apoptose einleiten (Song et al., 2005). Darüber hinaus konnte in HCT116 Kolonkarzinomzellen gezeigt werden, dass bei Seneszenz-induzierenden Doxorubicin-Konzentrationen der Tumorsuppressor p53 aktiviert wird und zur Expression des Zellzyklus Arrest Proteins p21 führt. Im Gegensatz dazu wird bei Apoptose-einleitenden Doxorubicin-Konzentrationen p53 aktiviert, ohne die p21 Expression zu verstärken (Zhang et al., 2011).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Anschluss das endogene und durch 200 ng/ml Doxorubicin-induzierte *PANDAR* RNA Level in einem Panel humaner Zelllinien mittels quantitativer Real Time PCR untersucht (Abbildung 12A). Das endogene *PANDAR* RNA Level zeigte eine zelllinienabhängige Expression, wobei HT29 (p53^{R273H}) und HepG2 die stärkste *PANDAR* Expression aufwiesen. Hinsichtlich der zuvor erhaltenen Ergebnisse der Doxorubicin-Titration, wurden für die nachfolgenden Experimente 200 ng/ml Doxorubicin verwendet. Da Doxorubicin p53-vermittelt die Expression von *PANDAR* RNA über den *CDKN1A* Promotor induzieren kann, sollte der zeitabhängige Doxorubicin-Effekt dieser Induktion analysiert werden (Abbildung 12B). Hierbei zeigte sich für U87 Glioblastomzellen nach 24 h die höchste *PANDAR* RNA Expression mit einer 4-fachen Steigerung der *PANDAR*

RNA Menge. Dieser Inkubationszeitraum mit 200 ng/ml Doxorubicin wurde im Anschluss für die anderen Zelllinien übernommen und die Doxorubicin-induzierte *PANDAR* RNA Expression untersucht (Abbildung 12C).

Die Analyse der für 24 h mit Doxorubicin (200 ng/ml) kultivierten Zellen zeigte eine zelllinienabhängige *PANDAR* Expression im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Zellen. Die höchste Expression der *PANDAR* RNA konnte für die fetalen Vorhautfibroblasten BJ, Glioblastomzellen U373 (p53^{R273H}), U87, Osteosarkomzellen U2OS und Kolonkarzinomzellen HCT116 beobachtet werden. Eine mittlere (2-3-fache) *PANDAR* Expression zeigte sich in den immortalisierten Vorhaut-Fibroblasten BJ mut ((H-Ras^{G12V} SV40TL htert), Lungenkarzinomzellen A549, Prostatakarzinomzellen DU145 (p53^{P223L/V274F}) und Leberkarzinomzellen HepG2. Hingegen wiesen die Brustkarzinomzellen MCF7 und Kolonkarzinomzellen HT29 (p53^{R273H}) keine durch Doxorubicin-induzierte *PANDAR* Expression auf.

Wichtige Aspekte bei der Doxorubicin-induzierten *PANDAR*-Expression sind unter anderem vorhandene Mutationen im *TP53* Gen (p53 Protein) (Hung et al., 2011). Etwa 50% aller humanen Tumore weisen eine Mutation in dem Tumorsuppressor-Gen *TP53* auf, wobei die Mehrzahl der Mutationen in der DNA Bindedomäne liegt, wodurch die Bindung von p53 an die DNA gestört wird (Soussi and Lozano, 2005). Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit einer p53-Mutation sind DU145 (p53^{P223L/V274F}), HT29 (p53^{R273H}) und U373 (p53^{R273H}).

Bei der p53^{R273H} Mutation handelt es sich um eine Hotspot Mutation, die unter anderem in dem Li Fraumeni Syndrom, einer familiären Krebs-Prädisposition, beobachtet werden kann (Olive et al., 2004). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Gain-of-Function Mutation p53^{R273H} bei Doxorubicin verursachten DNA Schaden selektiv die *PANDAR* Transkription aktiviert, jedoch nicht die Transkription des *CDKN1A* Gens (p21 Protein). Dies deutet auf einen Mechanismus hin, der den p21-vermittelten Zellzyklusarrest von der *PANDAR* Zellantwort entkoppelt (Hung et al., 2011). Diese erhöhte Doxorubicin-induzierte *PANDAR* RNA Expression konnte in den Glioblastomzellen U373 (p53^{R273H}) beobachtet werden, jedoch nicht in den Darmkrebszelllinie HT29, welche die gleiche p53 Mutation besitzt. Interessanterweise konnte, im Vergleich zu den U373 Zellen, in den HT29 Zellen ein bereits erhöhtes endogenes *PANDAR* Level beobachtet werden. Diese unterschiedlichen Effekte können auf zusätzliche Mutationen oder Regulationsmechanismen dieser Zelllinien zurückzuführen sein (Ahmed et al., 2013a; Lee et al., 2011).

Die Prostatakarzinom Zelllinie DU145 mit zwei p53 Mutationen (p53^{P223L} und p53^{V274F}) auf zwei verschiedenen Allelen zeigt ein mittleres *PANDAR* RNA Level und eine leichte

Doxorubicin-induzierte *PANDAR* Expression. Gurova et al. konnten zeigen, dass die Mutationen p53^{P223L}/p53^{V274F} unter DNA Schaden zu keiner Induktion von p21 führt. Darüber hinaus zeigte sich, dass die beiden Mutationen kooperativ zur Fas-Resistenz beitragen (Gurova et al., 2003). Auch hier könnte ein ähnlicher Mechanismus wie bei der p53^{R273H} Mutation vorliegen, sodass die p53-abhängige Aktivierung der Promotorregionen durch die Mutation so verändert wird, dass *PANDAR* jedoch nicht *CDKN1A* (p21) transkribiert wird. Auch die Fas-Resistenz könnte durch *PANDAR* begünstigt werden, da *PANDAR* eine wichtige Rolle in der Regulation von p53-abhängigen NF- κ B Apoptose-involvierten Zielgenen, wie dem *FAS* Gen, spielt (Hung et al., 2011; Han et al., 2015).

Der Vergleich der BJ Zelllinie mit der immortalisierten BJ mut (H-Ras^{G12V} SV40TL htert) Zelllinie zeigt unterschiedliche RNA Level hinsichtlich der endogenen und Doxorubicin-induzierten *PANDAR* Expression. Der Unterschied im endogenen *PANDAR* Level ist vermutlich auf das onkogene H-Ras^{G12V} in den BJ mut Zellen zurückzuführen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das onkogene H-Ras die Expression von *PANDAR* regulieren kann (Kotake et al., 2014). Darüber hinaus kann das Simian Virus T-large Antigen (SV40TL) in den BJ mut Zellen für das geringfügige, durch Doxorubicin-induzierte *PANDAR* RNA Level verantwortlich sein. Das T-large Antigen bindet an die DNA bindende Domäne, wodurch p53 an der DNA-Bindung gehindert wird (Bargonetti et al., 1992).

Die Ergebnisse der *PANDAR* Expression der Zelllinien U2OS, U87 und HCT116, welche keine p53-Mutation besitzen, deuten auf einen Zusammenhang des endogenen und Doxorubicin-induzierten *PANDAR* Levels hin. Hier ging eine mittlere endogene *PANDAR* Expression mit einer verstärkten Induzierbarkeit durch Doxorubicin einher. Im Gegensatz dazu, zeigte die Zelllinien HepG2 mit dem höchsten endogenen *PANDAR* Level nur eine geringfügige Steigerung der *PANDAR* RNA nach Doxorubicin Inkubation. Hier liegt eventuell ein selbstregulierender Mechanismus vor, bei dem die Zelle ein maximales Level an *PANDAR* RNA besitzt und dieses nicht übersteigt.

Die fehlende *PANDAR*-Induktion durch Doxorubicin in der MCF7-Zelllinie kann auf eine für diese Zelllinie zu geringe Doxorubicin-Konzentration zurückzuführen sein. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Doxorubicin-Titration überein, da auch hier bei 200 ng/ml Doxorubicin kein Effekt beobachtet werden konnte. Die NSCLC-Zelllinien A549 zeigte ebenfalls nur ein relativ geringes endogenes *PANDAR* RNA Level, welches auch durch Doxorubicin nur gering gesteigert werden konnte. Im Rahmen einer Studie an 140 humanen NSCLC Patienten Proben konnte gezeigt werden, dass ein reduziertes *PANDAR* RNA Level negativ mit der Tumorgroße und dem TNM Stage korreliert war (Han et al., 2015).

Für fortführende Experimente wurde eine stabile *PANDAR* überexprimierende U2OS Zelllinie generiert und das Zellüberleben durch verschiedene Doxorubicin-Konzentrationen überprüft (Abbildung 13A und B). Obwohl bereits in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass eine *PANDAR* Überexpression häufig mit einer schlechteren Überlebensrate einhergeht, konnte in diesen *PANDAR* überexprimierenden Zellen kein offensichtlicher Überlebensvorteil gegenüber den wildtypischen U2OS Zellen beobachtet werden. Dies kann vermutlich darauf zurückzuführen sein, dass diese durch das bereits erhöhte endogene *PANDAR* Level einen Überlebensvorteil haben und somit nicht auf weitere Erhöhung des *PANDAR* RNA Levels ansprechen. Der Überlebensvorteil, durch die bereits endogene *PANDAR* RNA Expression, konnte anhand von transienten *PANDAR* Knockdowns beobachtet werden (Abbildung 13C und D). Hierbei führte eine Reduktion von *PANDAR* RNA zu einer reduzierten Zellviabilität. In hepatozellulären Karzinomen und Brustkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass ein *PANDAR* Knockdown zu einem G0/G1 Zellzyklus Arrest führt (Peng and Fan, 2015; Sang et al., 2016). Des Weiteren wurden bereits Studien hinsichtlich der *PANDAR* RNA Expression in Tumorpatienten durchgeführt. Hierbei konnte eine signifikant erhöhte *PANDAR* RNA Menge in Tumorgeweben, wie hepatozellulären Karzinomen und Magenkarzinomen, im Vergleich zu benachbartem gesundem Organgewebe beobachtet werden (Peng and Fan, 2015; Ma et al., 2016).

5.2 Der trimere NF-Y Komplex

Der trimere Transkriptionsfaktor NF-Y, bestehend aus den Untereinheit NF-YA, NF-YB und NF-YC, bindet über die DNA-bindende Domäne von NF-YA an Promotorregionen mit CCAAT-Element (Mantovani, 1999; Nardini et al., 2013). Bisherige Studien konnten zeigen, dass die lncRNA *PANDAR* mit der Untereinheit NF-YA des trimeren NF-Y Komplexes interagiert. Durch die Interaktion der *PANDAR* RNA mit NF-YA, wird NF-YA davon abgehalten an Promotorregionen zu binden und zu aktivieren (Hung et al., 2011; Han et al., 2015). Im Rahmen der Veröffentlichungen wurde jedoch nicht erwähnt, ob bei dieser Interaktion auch die Untereinheiten NF-YB und NF-YC involviert sind. Um dies zu überprüfen wurden im Rahmen dieser Arbeit die NF-Y Fragmente (NF-YA₂₃₃₋₃₀₃, NF-YB₅₁₋₁₄₃ und NF-YC₂₇₋₁₂₀) aufgereinigt, die NF-Y Komplexformierung mit DNA und das NF-Y Bindepotenzial an *PANDAR* RNA überprüft. Das NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ Fragment, welches an den NF-YB/NF-YC heterodimeren Komplex bindet und eine DNA-Bindedomänen besitzt, konnte erfolgreich heterolog exprimiert und aufgereinigt werden (Abbildung 14). Auch die heterologe Expression und Aufreinigung des heterodimeren Komplexes von NF-YB₅₁₋₁₄₃ und

NF-YC₂₇₋₁₂₀ verlief erfolgreich (Abbildung 15). Die nachfolgende Überprüfung der Komplexformierung des NF-Y Trimers mit einem DNA Oligoduplex mit CCAAT-Element zeigte mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) die Formierung des DNA-Protein-Komplexes (Abbildung 16). Im Anschluss wurde das Interaktionspotenzials von aufgereinigtem NF-Y mit der *in vitro* transkribierten *PANDAR* RNA mittels RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay (REMSA) überprüft (Abbildung 17). Hierbei konnte eine Interaktion von *PANDAR* mit der NF-YA₂₃₃₋₃₀₃ Untereinheit und mit dem NF-Y Fragment-Trimer, jedoch nicht mit dem NF-YB₅₁₋₁₄₃/ NF-YC₂₇₋₁₂₀ Heterodimer, beobachtet werden. Das verwendete aufgereinigte NF-YA Fragment besteht aus der Protein- und DNA-bindenden Domäne (Abbildung 8). Da die *PANDAR* RNA sowohl mit dem NF-YA-Fragment, als auch dem NF-Y Trimer interagiert, ist es unwahrscheinlich, dass die Interaktion der *PANDAR* RNA durch die Protein-bindenden Domäne von NF-YA vermittelt wird, da diese Domäne bereits an der Formung des NF-Y Komplexes beteiligt ist. Dadurch könnte die DNA-bindende Domäne von NF-YA als mögliche Bindestelle für die *PANDAR* RNA dienen. Dies geht mit der *PANDAR* Funktion einher NF-YA von der DNA-Bindung abzuhalten. Gegebenenfalls kompetitiert *PANDAR* mit der DNA um die Bindung der DNA-bindenden Domäne von NF-YA. Somit könnte die NF-YA DNA-bindende Domäne eine DNA-RNA-bindende Domäne (DRBD) darstellen. Das Vorhandensein dieser DRBDs konnte bereits in einer Vielzahl von Proteinen beobachtet werden und spielt eine wichtige Rolle in lncRNA-Protein Interaktionen (Hudson and Ortlund, 2014). Ein Beispiel hierfür ist das DNA-RNA-bindende Protein Fused in Sarcoma (FUS; Synonym: TLS) mit einer RRM und Zink Finger Domäne. Über diese Domänen kann FUS mit ssDNA, dsDNA, ncRNA und mRNA interagieren (Castello et al., 2012; Wang et al., 2008; Baechtold et al., 1999).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Anschluss überprüft werden, welches RNA Bindemotiv NF-YA erkennt und bindet. Hierfür wurde ein Flag-NF-YA PAR-CLIP (Abbildung 10) mit anschließender Next Generation Sequencing und bioinformatischer Analyse durchgeführt. Bei der Auswertung der erhaltenden RNA-Fragmente, welche an NF-YA gebunden haben, konnte gezeigt werden, dass das Bindemotiv der genomisch annotierten Sequenz C(T/A)G(A/T) in 90% der RNA-Fragmente vorhanden war (Abbildung 20). Auch die Lncipedia.org Datenbank-Analyse hinsichtlich der Sequenzen, die nicht gegen das Genom oder Transkriptom aligniert haben, zeigte ein im Experiment 1 und 2 überlagertes Bindemotiv der genomisch annotierten Sequenz TCTG. Beide Bindemotive können in der Sequenz der *PANDAR* RNA, die im PAR-CLIP erhalten wurde, beobachtet werden. Dies deutet auf eine direkte Bindung von NF-YA an *PANDAR* RNA hin, welche auch bei dem zuvor

durchgeführten REMSA (Abbildung 17) zu sehen war. Zur Überprüfung des RNA-Bindemotivs C(T/A)G(A/T) wurde dieses in der erkannten Region der *PANDAR* RNA mutiert und die Interaktion mit NF-YA überprüft (Abbildung 21). Hierbei zeigte sich eine Interaktion von NF-YA mit den wildtypischen und mutierten Binderegionen. Darüber hinaus konnte jedoch auch eine Bindung an zwei Kontroll-RNAs beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten hier auf eine nicht Sequenz-spezifische RNA-Interaktion von NF-YA hin. Eine mögliche Ursache für diese im REMSA beobachtete Sequenz-unspezifische Interaktion können zu kurz gewählte RNA-Fragmente sein, wodurch die RNA-Sekundärstruktur, welche auch zur Spezifität beitragen kann, beeinträchtigt wird. Für eine weiterführende Untersuchung dieses Bindemotivs sollten somit längere RNA-Fragmente in Betracht gezogen werden.

Eine weitere Erklärung könnte neben den gewählten Salzkonzentrationen und NF-YA als unspezifischer RNA-Binder, das verwendete verkürzte NF-YA Fragment sein. Da in dem PAR-CLIP Experiment mit dem zellulären Vollängen NF-YA Protein gearbeitet wurde, ist es möglich, dass für eine Sequenz-spezifische RNA-Interaktion weitere Domänen des NF-YA Vollängenproteins notwendig sind. Ein weiterer Aspekt stellen eventuell fehlende posttranslationale Modifikationen des verwendeten heterologen NF-YA Fragments dar. In der humanen Zelle wird NF-YA durch die Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) in der Nähe der DNA-bindenden Domäne phosphoryliert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die phosphorylierungsdefiziente NF-YA Mutante (NF-YA (lange Isoform: S320A, S326A) an der Transkription von NF-YA Zielgenen, wie Cyclin-dependent kinase 1 (*CDK1*, Synonym: *CDC2*) und G2/mitotic-specific cyclin-B1 (*CCNB1*), gehindert wird (Yun et al., 2003; Chae et al., 2004). Der hier postulierte Signalweg erfolgt über die p53-abhängige Induktion des CDK-Inhibitors p21, wodurch CDK2 inhibiert wird und somit auch die NF-YA Phosphorylierung und die Transkription der NF-YA Zellzyklus-Zielgene (Chae et al., 2011). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung von NF-YA eine wichtige Rolle spielt und somit eventuell auch in der spezifischen Erkennung und Bindung der RNA beteiligt sein kann. Eine solche phosphorylierungsabhängige verstärkte lncRNA-Protein Bindung konnte beispielsweise bei der Interaktion der PRC2 Komponente Ezh2 mit den lncRNAs *HOTAIR* und *Xist* beobachtet werden (Kaneko et al., 2010). Zur Überprüfung, ob die Sequenz-spezifische Interaktion der im NF-YA PAR-CLIP erhaltenen RNAs, wie der *PANDAR* RNA, von posttranslationalen Modifikationen oder auch von weiteren NF-YA Domänen abhängig ist, sollten für weitere Analysen posttranslational modifiziertes NF-YA und Vollängen NF-YA in Betracht gezogen werden.

5.3 Identifizierung der *PANDAR*-interagierenden Proteine mittels PNA-SILAC

Es konnte bereits in vorherigen Studien gezeigt werden, dass die lncRNA *PANDAR* mit Proteinen, wie SAFA und NF-YA, interagiert und somit in verschiedenen Prozessen wie der Regulation der Apoptose, Seneszenz und G1/S Transition beteiligt ist (Hung et al., 2011; Puvvula et al., 2014; Han et al., 2015; Sang et al., 2016).

Um weitere mögliche Protein-Bindepartner der *PANDAR* RNA zu identifizieren, wurde eine PNA-basierte SILAC-MS Analyse durchgeführt (Abbildung 25). Hierfür wurden zuvor *PANDAR* spezifische PNAs designt, wobei die Zugänglichkeit der PNA-Sequenzen berücksichtigt werden musste (Abbildung 22). Die PNA Sequenzen PNA1, PNA2 und PNA3 wurden erfolgreich mittels Festphasen Synthese hergestellt, mit Biotin oder FITC gekuppelt und aufgereinigt. Die Affinitätsanalyse der FITC-PNAs an *in vitro* transkribierte *PANDAR* RNA mittels Fluoreszenz Polarisations Messung ergab eine Bindung im nM Bereich (Abbildung 24A). Darüber hinaus konnten die drei PNA Sequenzen *PANDAR* RNA aus totaler isolierter RNA anreichern (Abbildung 24B). Insgesamt zeigten sich die besten Effizienzen für die Sequenzen PNA1 und PNA3, welche basierend auf der vorhergesagten *PANDAR*-Sekundärstruktur (mfold), an Regionen mit nicht vollständiger RNA-RNA Basenpaarung binden.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden die Sequenzen PNA1 beziehungsweise PNA3 in der SILAC-basierten massenspektrometrischen Analyse eingesetzt, um spezifische *PANDAR*-Interaktoren zu identifizieren. Die Auswertung der massenspektrometrischen Daten ergab einen Überlapp der beiden PNAs für 22 potenzielle *PANDAR*-bindende Proteine, wobei die meisten im Zellkern lokalisiert waren, eine RNA Bindedomäne enthielten und im RNA Spleißen involviert waren (Abbildung 26). Im Rahmen dieser Ergebnisse konnten die bereits bekannten *PANDAR*-Interaktionspartner SAFA und NF-YA nicht detektiert werden. Nach zwei weiteren Validierungsprozessen der potenziellen *PANDAR*-interagierenden Proteine, wobei NF-YA und SAFA berücksichtigt wurden, verblieben die Proteine SAFA (hnRNPU), hnRNPUL1, PTBP1 (hnRNPI) und U2AF65 (Abbildung 27, Abbildung 28).

Interessanterweise besitzen hnRNPUL1 und der bereits publizierte *PANDAR*-Interaktionspartner SAFA (Synonym: hnRNPU) gleiche strukturelle Charakteristika mit ähnlichen Domänenmotiven und sind in biologischen Prozessen, wie RNA Prozessierung und Spleißen, involviert (Gabler et al., 1998; Xiao et al., 2012). Darüber hinaus sind die beiden Proteine in unterschiedlichen Prozessen in der Zelle beteiligt, die unter anderem durch die Interaktion mit lncRNAs vermittelt werden. Die bereits publizierte Interaktion von *PANDAR* RNA an SAFA reguliert die Promotor-Rekrutierung des Polycomb-Repressiven-Komplexes

(Puvvula et al., 2014; Bischof and Puvvula, 2015). Hingegen führt die Interaktion von hnRNPUL1 mit der lncRNA DNA damage-sensitive RNA1 (*DDSR1*) zur Modulation der homologen Rekombination. Hierbei wird die Zugänglichkeit von Breast Cancer type 1 (BRCA1) und der BRCA1-A Komplex Untereinheit RAP80 zu DNA Doppelstrang-Brüchen reguliert (Sharma et al., 2015).

Ein weiteres Mitglied der hnRNP Familie ist der gut charakterisierte Spleiß-Repressor PTBP1 mit vier RNA Erkennungsmotiven (RRM). Die Bindung von PTBP1 erfolgt an CU-reiche Elemente, welche jedoch häufig mit der Bindestelle des Spleißfaktors U2AF65 nahe der 3'-Spleißregion überlappen. Dadurch wird angenommen, dass die PTBP1-vermittelte Repression des Spleißens durch die Konkurrenz mit U2AF65 erfolgt (Saulière et al., 2006; Singh et al., 1995). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass PTBP1 je nach Binderegion ebenfalls als Spleiß-Aktivator fungieren kann (Llorian et al., 2010). Des Weiteren kann PTBP1 durch die Interaktion mit der lncRNA *Pnky* die Expression und das Spleißen von Transkripten, die mit der neuronalen Differenzierung zusammenhängen, regulieren (Ramos et al., 2015).

Die im prä-mRNA Spleißen involvierte U2AF65 Untereinheit besteht aus drei RRM und einer S/R-reichen Domäne (Zamore et al., 1992) und ist ein essentieller Bestandteil für die Assemblierung des Spleiß-Komplexes (Wahl et al., 2009). Das U2AF Heterodimer, bestehend aus Spleißfaktor U2AF 35kDa Untereinheit (U2AF35) und U2AF65, definiert die 3'-Spleiß-Schnittstelle durch die Bindung von U2AF65 an die Polypyrimidin Trakt-Region, wodurch das alternative Spleißen reguliert wird (Whisenant et al., 2015). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von U2AF65 an prä-mRNA abgehalten werden kann, indem U2AF65 an gering affine Bindestellen der lncRNA *MALAT1* und *NEAT1* bindet und somit in subnukleären Strukturen zurückgehalten wird (Schor et al., 2012).

Da diese Proteine in ähnlichen zellulären Prozessen beteiligt sind, wurde überprüft, ob diese Kandidaten im Protein-Proteinkomplex vorliegen und ob dieser Komplex durch RNA vermittelt wird (Abbildung 29). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine PTBP1 und SAFA mit hnRNPUL1 gebunden vorlagen, wobei diese Interaktion durch RNase Behandlung nicht mehr vorlag. Die Co-Immunopräzipitation mit eGFP-hnRNPUL1 zeigte allerdings keine Bindung der Proteine PTBP1 und SAFA. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass hnRNPUL1 bereits vollständig im Komplex mit endogenem hnRNPUL1 vorlag, wodurch die Zugänglichkeit beeinträchtigt sein kann. Diese Interaktion von eGFP-Fusionsprotein mit dem endogenen Protein konnte auch für PTBP1 und SAFA beobachtet werden, allerdings nicht in dem gleichen Ausmaß. Im Falle von SAFA

wurde diese Komplexbildung durch RNase Behandlung aufgehoben. Die Komplexbildung von eGFP-U2AF65 und endogenem U2AF65 konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Proteine PTBP1 und SAFA RNA-vermittelt mit hnRNPUL1 interagieren. Eine Reihe von Studien konnte bereits zeigen, dass hnRNPs miteinander interagieren können (Chou et al., 2000; Torosyan et al., 2010; Hahm et al., 1998). Ein Beispiel hierfür sind die Proteine hnRNPUL1 und hnRNPUL2 die sowohl miteinander interagieren, als auch Homodimere bilden (Pratt, 2012). Im Falle von PTBP1 konnte gezeigt werden, dass es unter oxidativen Bedingungen als Homodimer und in der reduzierenden intrazellulären Umgebung als Monomer vorliegt (Pérez et al., 1997; Monie et al., 2005). Sowohl die monomere als auch die dimere PTBP1-Form können RNA binden und weisen die gleiche Konsensus-Sequenz auf (Xue et al., 2009).

Da die Interaktion von hnRNPUL1 mit PTBP1 und SAFA durch RNase zerstört wurde und somit RNA-abhängig vorlag, kann zum einen gezeigt werden, dass die *PANDAR*-interagierenden Proteine nicht im direkten Protein-Protein-Komplex gebunden vorlagen. Des Weiteren ist es möglich, dass hnRNPUL1 an eine andere *PANDAR*-Bindestelle als SAFA bzw. PTBP1 bindet, sodass die *PANDAR* RNA diese Proteine in räumliche Nähe zueinander bringt. Ein weiterer Aspekt der die Bindung von PTBP1 an *PANDAR* RNA unterstützt, ist der *PANDAR*-Interaktionspartner U2AF65, der mit keinem der untersuchten Proteine gebunden vorlag. Da vorherige Studien zeigen konnten, dass PTBP1 und U2AF65 um die Bindung an Polypyrimidin Trakts konkurrieren (Saulière et al., 2006; Singh et al., 1995), ist es möglich, dass sie auch um die gleiche Bindestelle der *PANDAR* RNA konkurrieren. Da auch SAFA nicht mit PTBP1 und U2AF65 im Komplex vorlag, ist es möglich, dass auch SAFA um dieselbe *PANDAR*-Bindestelle konkurriert. Falls die *PANDAR*-interagierenden Proteine um die gleiche Bindestelle konkurrieren, so kann die Interaktion affinitätsabhängig sein. Dabei muss berücksichtigt werden, dass diese Proteine in der Zelle auch in anderen Komplexen vorliegen, wodurch die Affinität beeinflusst wird.

Diese Abhängigkeit kann auch am Beispiel der bereits publizierten *PANDAR*-Interaktionspartner NF-YA und SAFA in Fibroblasten erläutert werden (Puvvula et al., 2014). Die Interaktion dieser Partner ist abhängig von dem Zellstatus und damit einhergehend der *PANDAR* RNA Menge in der Zelle. In seneszenten Fibroblasten ist das *PANDAR* RNA Level erhöht und *PANDAR* interagiert bevorzugt mit NF-YA. Im Gegensatz dazu, ist in proliferativen Fibroblasten das *PANDAR* RNA Level geringer, was unter anderem durch die bevorzugte Interaktion mit SAFA und der nachfolgenden Inaktivierung des *PANDAR* Promotors von *CDKN1A* bedingt ist (Puvvula et al., 2014). Diese Ergebnisse zeigen, dass die

Interaktion von *PANDAR* RNA und den Bindepartnern von vielen Faktoren abhängen kann, was auch erklären könnte, weshalb die Proteine NF-YA und SAFA nicht in dem initialen SILAC Experiment gefunden wurden (Abbildung 26). Hierbei könnte neben dem endogenen Proteinlevel auch die Interaktion dieser Proteine mit anderen Interaktoren eine mögliche Ursache darstellen. Im Rahmen der Überexpression von SAFA bzw. NF-YA und der nachfolgenden RNA-Immunopräzipitation konnte beobachtet werden, dass die lncRNA *PANDAR* an SAFA, jedoch nicht an NF-YA, gebunden vorlag (Abbildung 27). Eine mögliche Erklärung für die hier nicht detektierte *PANDAR* NF-YA Interaktion könnte eine geringe Affinität der beiden Interaktionspartner sein, die durch die evtl. höher affine Interaktionen mit den anderen *PANDAR*-bindenden Proteinen verdrängt wird.

Insgesamt könnte es sich bei einem Teil der im SILAC Experiment erhaltenden Proteine, welche keine oder nur eine mittlere *PANDAR* RNA Anreicherung in dem RIP-Experiment gezeigt haben (Abbildung 27), um co-immunopräzipitierte Proteinkomplexe der *PANDAR*-Interaktoren hnRNPUL1, SAFA, PTBP1 oder U2AF65 handeln.

5.3.1 *PANDAR* beeinträchtigt das PTBP1-vermittelte *BCL-XS* Spleißen

Bei Bcl-X handelt es sich um ein Mitglied der Bcl2 Familie, welches eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose spielt. Durch alternatives Spleißen des Exons2 der *BCL-X* prä-mRNA können zwei antagonistisch wirkende Isoformen entstehen, das anti-apoptotische Bcl-XL und das pro-apoptotische Bcl-XS (Boise et al., 1993).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das alternative Spleißen dieser prä-mRNA unter anderem durch den Spleiß-Regulator Src-associated in mitosis 68 kDa protein (Sam68) reguliert wird (Paronetto et al., 2007; Bielli et al., 2014b). Das RNA-bindende Proteine Sam68 kann wiederum durch die vom gegenüberliegenden Strang des *BCL-X* Gens transkribierte apoptotic BCL2L1-antisense lncRNA (*ABALON*; Synonym: *INXS*) gebunden werden, wodurch das Spleißen der pro-apoptotischen *BCL-XS* Variante verstärkt wird (Deocesano-Pereira et al., 2014). Eine weitere Regulationsebene des alternativen Spleißens der *BCL-X* prä-mRNA erfolgt durch hnRNPs, wie hnRNPF, H und K (Garneau et al., 2005; Revil et al., 2009). Auch das der hnRNP-Familie zugehörige PTBP1 (hnRNPI) ist am Spleißen dieser prä-mRNA beteiligt und initiiert die pro-apoptotischen Variante *BCL-XS*, indem es den am *BCL-XL* Spleißen involvierten Spleißfaktor SRSF1 verdrängt (Bielli et al., 2014a).

Um nun zu überprüfen, ob *PANDAR* das durch PTBP1-vermittelte *BCL-XS* Spleißen durch die Interaktion mit PTBP1 beeinflusst, wurde das *BCL-XS* mRNA-Level analysiert

(Abbildung 30). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *PANDAR* RNA zu einer Reduktion von *BCL-XS* mRNA führt. Dieser Effekt konnte durch die gleichzeitige Überexpression von PTBP1 wieder ausgeglichen werden. Dies deutet daraufhin, dass eine Überexpression von *PANDAR* RNA PTBP1 abfängt, wodurch es am Spleißen der *BCL-XS* Variante gehindert wird. Die gleichzeitige Überexpression von *PANDAR* RNA und PTBP1 deutet daraufhin, dass *PANDAR* mit PTBP1 Protein abgesättigt ist, wodurch das zusätzliche freie PTBP1 das Spleißen der *BCL-XS* Variante initiieren kann.

Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass die lncRNA *PANDAR* als molekularer Decoy fungieren kann, um Spleißfaktoren zu binden und somit den Spleißprozess zu regulieren (Modell Abbildung 31). Das Beispiel der durch *PANDAR* RNA vermittelten Reduktion der pro-apoptotischen *BCL-XS* Variante könnte eine wichtige Rolle in der verstärkten Zellwachstumsrate in *PANDAR*-überexprimierenden Tumoren spielen.

6. Zusammenfassung

Die Expression der lncRNA *PANDAR* wird p53-abhängig über den *CDKN1A* Promotor induziert (Hung et al., 2011). Eine Überexpression der lncRNA *PANDAR* konnte bereits in einigen Tumorarten beobachtet werden, wobei diese erhöhte Expression mit einem invasiven Phänotyp und einer schlechten Überlebensprognose einherging (Ma et al., 2016; Peng and Fan, 2015). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass das endogene und durch Doxorubicin-induzierte *PANDAR* RNA Level je nach Zelllinie variiert. Darüber hinaus führte der *PANDAR* Knockdown in U2OS Osteosarkomzellen zu einer verringerten Zellviabilität, was auf eine Funktion der lncRNA *PANDAR* im Zellerhalt hindeutet.

Ein Mechanismus für diesen Regulationsprozess ist die Decoy-Funktion der lncRNA *PANDAR*, wobei die Transkriptionsfaktor-Untereinheit NF-YA von den pro-apoptotischen Zielgenen entfernt wird (Hung et al., 2011). Die Analyse der direkten Bindung der lncRNA mit heterolog exprimierten und aufgereinigten NF-Y Fragmenten ergab eine Interaktion der *PANDAR* RNA mit der NF-YA Untereinheit und dem trimeren NF-Y Komplex. Dies deutet auf eine Bindung von *PANDAR* an eine Region von NF-YA hin, die nicht an der Formung des trimeren Komplexes beteiligt ist. Die Identifizierung des RNA-Bindemotivs von NF-YA ergab die genomisch annotierte Sequenzabfolge C(T/A)G(A/T). Jedoch zeigten die nachfolgend durchgeführten *in vitro* Mutationsstudien, dass das NF-YA-Fragment sowohl mit wildtypischen als auch mutierten *PANDAR* RNA Fragmenten Sequenz-unabhängig interagiert. Die Sequenzspezifität des im NF-YA PAR-CLIP ermittelten RNA-Bindemotivs könnte daher durch weitere Regulationsebenen, wie RNA-Sekundärstrukturen, posttranslationalen Proteinmodifikationen oder auch durch zusätzlich involvierte NF-YA Domänen des Volllängenproteins vermittelt werden.

Für die Identifizierung weiterer *PANDAR*-bindende Proteine wurden gegen *PANDAR* gerichtete PNAs synthetisiert, getestet und im PNA-basierten SILAC-Experiment verwendet. Zusätzliche Validierungsprozesse der massenspektrometrisch analysierten Ergebnisse ergab eine Interaktion mit den unter anderem am Spleißprozess beteiligten Proteinen SAFA, hnRNPUL1, U2AF65 und PTBP1. Darüber hinaus wurde der Effekt der lncRNA *PANDAR* hinsichtlich der Transkriptvariante *BCL-XS* analysiert, wobei PTBP1 das alternative Spleißen dieser Variante initiiert (Bielli et al., 2014a). Die Überexpression der lncRNA *PANDAR* führte zu einer Reduktion der mRNA des pro-apoptotischen Bcl-XS. Hingegen konnte die gleichzeitige Überexpression von PTBP1 diese Reduktion wieder normalisieren. Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann eine neue Funktion der lncRNA *PANDAR* hinsichtlich der Regulation des *BCL-XS* alternativen Spleißens vermutet werden (Abbildung 31).

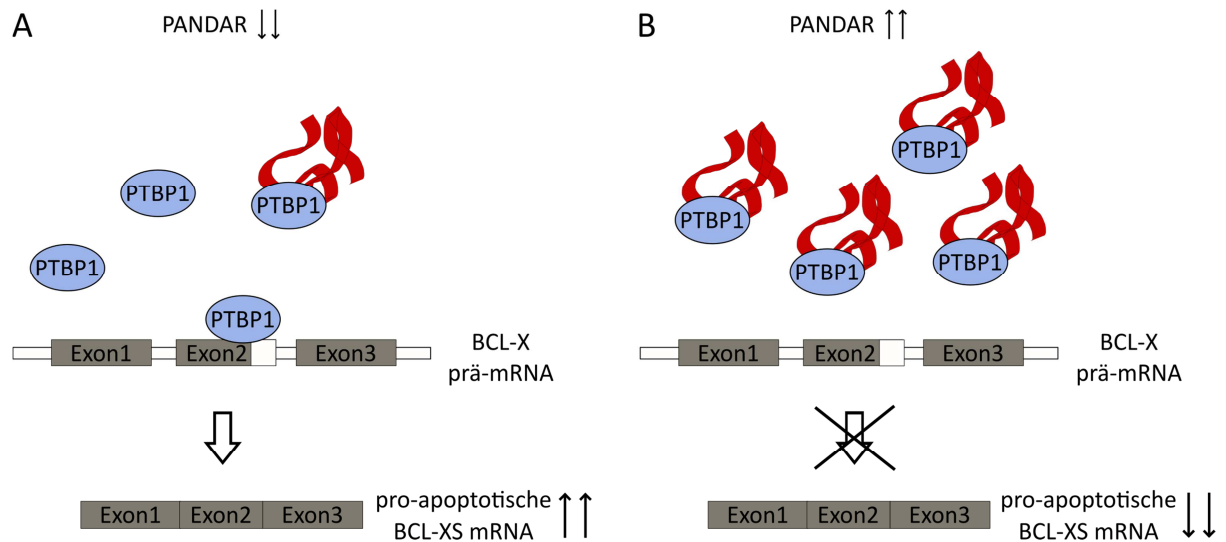


Abbildung 31: Modell der *PANDAR*-abhängigen Regulation des *BCL-XS* alternativen Spleißens

A) In einer Zelle mit normalem *PANDAR* RNA (rot) Level interagiert PTBP1 mit der *BCL-X* prä-mRNA und initiiert das alternative Spleißen von *BCL-XS* mRNA. B) Bei einer *PANDAR* Überexpression interagiert *PANDAR* mit PTBP1, wodurch das alternative Spleißen der *BCL-XS* mRNA reduziert wird.

7. Ausblick

Basierend auf den in dieser Arbeit erhaltenden Ergebnissen gilt es weiterhin zu untersuchen, welche zellulären Prozesse die lncRNA *PANDAR* reguliert. Vor dem Hintergrund, dass in einigen Tumoren eine Überexpression der lncRNA *PANDAR* mit einer schlechten Prognose einherging (Ma et al., 2016; Peng and Fan, 2015; Sang et al., 2016; Zhan et al., 2016), sollte überprüft werden in wie weit *PANDAR* neben der Zelltodregulation auch an Prozessen, wie der verstärkten Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen involviert ist. Dies könnte eine wichtige Grundlage für die Wahl der jeweiligen Therapieansätze darstellen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Analyse der mit *PANDAR*-interagierenden Proteine hnRNPUL1, SAFA, U2AF65 und PTBP1 und welchen Einfluss diese Interaktionen auf die Zelle haben. Im Kontext der Tumorbiologie sollte darüber hinaus untersucht werden, ob diese Proteine gemeinsam mit der *PANDAR* Expression und Interaktion zu der Tumorentwicklung und -progression beitragen. Da die hier validierten *PANDAR*-interagierenden Proteine in Prozessen wie dem Spleißen beteiligt sind, sollte analysiert werden, ob *PANDAR* als RNA Decoy für Spleißfaktoren fungiert und somit in der Regulation des Spleißens involviert ist. Falls dies der Fall ist und dies zu der Progression der Tumorzellen beiträgt, kann es von Interesse sein die Protein-bindenden Regionen der lncRNA *PANDAR* zu identifizieren. Diese können einen möglichen Angriffspunkt für zellgängige Oligonukleotide darstellen, die an diese Region binden, die Interaktion mit den Proteinen verhindert und somit die Tumorprogression einschränkt.

8. Literatur

- Ahmed, D., P.W. Eide, I.A. Eilertsen, S.A. Danielsen, M. Eknæs, M. Hektoen, G.E. Lind, and R.A. Lothe. 2013a. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2:e71. doi:10.1038/oncsis.2013.35.
- Ahmed, W., I.S. Ali, M. Riaz, A. Younas, A. Sadeque, A.K. Niazi, S.H. Niazi, S.H.B. Ali, M. Azam, and R. Qamar. 2013b. Association of ANRIL polymorphism (rs1333049:C>G) with myocardial infarction and its pharmacogenomic role in hypercholesterolemia. *Gene*. 515:416–420. doi:10.1016/j.gene.2012.12.044.
- Angrand, P.-O., C. Vennin, X. Le Bourhis, and E. Adriaenssens. 2015. The role of long non-coding RNAs in genome formatting and expression. *Front. Genet.* 6:165. doi:10.3389/fgene.2015.00165.
- Änkö, M.L., and K.M. Neugebauer. 2012. RNA-protein interactions in vivo: Global gets specific. *Trends Biochem. Sci.* 37:255–262. doi:10.1016/j.tibs.2012.02.005.
- Ascano, M., M. Hafner, P. Cekan, S. Gerstberger, and T. Tuschl. 2011. Identification of RNA-protein interaction networks using PAR-CLIP. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 3:159–77. doi:10.1002/wrna.1103.
- Baechtold, H., M. Kuroda, J. Sok, D. Ron, B.S. Lopez, and A.T. Akhmedov. 1999. Human 75-kDa DNA-pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation. *J. Biol. Chem.* 274:34337–34342. doi:10.1074/jbc.274.48.34337.
- Bánfai, B., H. Jia, J. Khatun, E. Wood, B. Risk, W.E. Gundling, A. Kundaje, H.P. Gunawardena, Y. Yu, L. Xie, K. Krajewski, B.D. Strahl, X. Chen, P. Bickel, M.C. Giddings, J.B. Brown, and L. Lipovich. 2012. Long noncoding RNAs are rarely translated in two human cell lines. *Genome Res.* 22:1646–57. doi:10.1101/gr.134767.111.
- Bargonetti, J., I. Reynisdottir, P.N. Friedman, and C. Prives. 1992. Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev.* 6:1886–1898. doi:10.1101/gad.6.10.1886.
- Benatti, P., V. Basile, D. Merico, L.I. Fantoni, E. Tagliafico, and C. Imbriano. 2008. A balance between NF- κ B and p53 governs the pro- and anti-apoptotic transcriptional response. *Nucleic Acids Res.* 36:1415–28. doi:10.1093/nar/gkm1046.
- Benatti, P., M.L. Chiaramonte, M. Lorenzo, J.A. Hartley, D. Hochhauser, N. Gnesutta, R. Mantovani, and C. Imbriano. 2015. NF- κ B activates genes of metabolic pathways altered in cancer cells. 7. doi:10.18632/oncotarget.6453.
- Benatti, P., D. Dolfini, A. Viganò, M. Ravo, A. Weisz, and C. Imbriano. 2011. Specific inhibition of

- NF-Y subunits triggers different cell proliferation defects. *Nucleic Acids Res.* 39:5356–68. doi:10.1093/nar/gkr128.
- Bernstein, H.D., D. Zopf, D.M. Freymann, and P. Walter. 1993. Functional substitution of the signal recognition particle 54-kDa subunit by its Escherichia coli homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:5229–33. doi:10.1073/pnas.90.11.5229.
- Bielli, P., M. Bordi, V. Di Biasio, and C. Sette. 2014a. Regulation of BCL-X splicing reveals a role for the polypyrimidine tract binding protein (PTBP1/hnRNP I) in alternative 5' splice site selection. *Nucleic Acids Res.* 42:12070–12081. doi:10.1093/nar/gku922.
- Bielli, P., R. Bus, S.M. Di Stasi, M.J. Munoz, F. Botti, A.R. Kornblihtt, and C. Sette. 2014b. The transcription factor FBI-1 inhibits SAM68-mediated BCL-X alternative splicing and apoptosis. *EMBO Rep.* 15:419–427. doi:10.1002/embr.201338241.
- Bischof, O., and P.K. Puvvula. 2015. It Takes Four to Tango: Long Noncoding RNA PANDA, SAF-A, Polycomb Repressive Complexes and NF-Y in Senescence Regulation. *Rna Dis.* 1–5. doi:10.14800/rd.855.
- Blythe, A.J., A.H. Fox, and C.S. Bond. 2016. The ins and outs of lncRNA structure: How, why and what comes next? *Biochim. Biophys. Acta.* 1859:46–58. doi:10.1016/j.bbarm.2015.08.009.
- Boise, L.H., M. Gonzalez-Garcia, C.E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L.A. Turka, X. Mao, G. Nunez, and C.B. Thompson. 1993. Bcl-X, a Bcl-2 Related Gene That Functions As a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death. *Cell.* 74:597–608. doi:10.1016/0092-8674(93)90508-N.
- Bond, C.S., and A.H. Fox. 2009. Paraspeckles: Nuclear bodies built on long noncoding RNA. *J. Cell Biol.* 186:637–644. doi:10.1083/jcb.200906113.
- Boon, R.A., N. Jaé, L. Holdt, and S. Dimmeler. 2016. Long Noncoding RNAs From Clinical Genetics to therapeutic targets? *J. Am. Coll. Cardiol.* 67:1214–1226. doi:10.1016/j.jacc.2015.12.051.
- Bungartz, G., H. Land, D.T. Scadden, and S.G. Emerson. 2012. NF-Y is necessary for hematopoietic stem cell proliferation and survival. *Blood.* 119:1380–1389. doi:10.1182/blood-2011-06-359406.
- Cabili, M.N., C. Trapnell, L. Goff, M. Koziol, B. Tazon-Vega, A. Regev, and J. Rinn. 2011. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* 25:1915–1927. doi:10.1101/gad.17446611.
- Carrieri, C., L. Cimatti, M. Biagioli, A. Beugnet, S. Zucchelli, S. Fedele, E. Pesce, I. Ferrer, L. Collavin, C. Santoro, A.R.R. Forrest, P. Carninci, S. Biffo, E. Stupka, and S. Gustincich. 2012. Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature.* 491:454–7. doi:10.1038/nature11508.

- Castello, A., B. Fischer, K. Eichelbaum, R. Horos, B.M. Beckmann, C. Strein, N.E. Davey, D.T. Humphreys, T. Preiss, L.M. Steinmetz, J. Krijgsveld, and M.W. Hentze. 2012. Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell*. 149:1393–1406. doi:10.1016/j.cell.2012.04.031.
- Chae, H.-D., J. Kim, and D.Y. Shin. 2011. NF-Y binds to both G1- and G2-specific cyclin promoters; a possible role in linking CDK2/Cyclin A to CDK1/Cyclin B. *BMB Rep.* 44:553–7. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.8.553.
- Chae, H.-D., J. Yun, Y.-J. Bang, and D.Y. Shin. 2004. Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor is essential for the expression of the cell cycle-regulatory genes and cell cycle G1/S and G2/M transitions. *Oncogene*. 23:4084–4088. doi:10.1038/sj.onc.1207482.
- Childs, B.G., D.J. Baker, J.L. Kirkland, J. Campisi, J.M. van Deursen, and J.M. Van Deursen. 2014. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* 15:1–15. doi:10.15252/embr.201439245.
- Chou, M.Y., J.G. Underwood, J. Nikolic, M.H. Luu, and D.L. Black. 2000. Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing. *Mol. Cell*. 5:949–957. doi:10.1016/S1097-2765(00)80260-9.
- Clemson, C.M., J.N. Hutchinson, S.A. Sara, W. Alexander, A.H. Fox, A. Chess, and J.B. Lawrence. 2009. An Architectural Role for a Nuclear Non-coding RNA: NEAT1 RNA is Essential for the Structure of Paraspeckles. *Mol cell*. 33:717–726. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.026.An.
- Consortium, E.P., B.E. Bernstein, E. Birney, I. Dunham, E.D. Green, C. Gunter, and M. Snyder. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 489:57–74. doi:10.1038/nature11247.
- Crick, F.H. 1958. On Protein Synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12:138–163.
- Deocesano-Pereira, C., M.S. Amaral, K.S. Parreira, A.C. Ayupe, J.F. Jacysyn, G.P. Amarante-Mendes, E.M. Reis, and S. Verjovski-Almeida. 2014. Long non-coding RNA INXS is a critical mediator of BCL-XS induced apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 42:8343–8355. doi:10.1093/nar/gku561.
- Dieci, G., G. Fiorino, M. Castelnovo, M. Teichmann, and A. Pagano. 2007. The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet.* 23:614–622. doi:10.1016/j.tig.2007.09.001.
- Dinger, M.E., K.C. Pang, T.R. Mercer, and J.S. Mattick. 2008. Differentiating protein-coding and noncoding RNA: challenges and ambiguities. *PLoS Comput. Biol.* 4:e1000176. doi:10.1371/journal.pcbi.1000176.
- Djebali, S., C.A. Davis, A. Merkel, A. Dobin, T. Lassmann, A. Mortazavi, A. Tanzer, J. Lagarde, W.

- Lin, F. Schlesinger, C. Xue, G.K. Marinov, J. Khatun, B.A. Williams, C. Zaleski, J. Rozowsky, M. Roder, F. Kokocinski, R.F. Abdelhamid, T. Alioto, I. Antoshechkin, M.T. Baer, N.S. Bar, P. Batut, K. Bell, I. Bell, S. Chakraborty, X. Chen, J. Chrast, J. Curado, T. Derrien, J. Drenkow, E. Dumais, J. Dumais, R. Dutttagupta, E. Falconnet, M. Fastuca, K. Fejes-Toth, P. Ferreira, S. Foissac, M.J. Fullwood, H. Gao, D. Gonzalez, A. Gordon, H. Gunawardena, C. Howald, S. Jha, R. Johnson, P. Kapranov, B. King, C. Kingswood, O.J. Luo, E. Park, K. Persaud, J.B. Preall, P. Ribeca, B. Risk, D. Robyr, M. Sammeth, L. Schaffer, L.H. See, A. Shahab, J. Skancke, A.M. Suzuki, H. Takahashi, H. Tilgner, D. Trout, N. Walters, H. Wang, J. Wrobel, Y. Yu, X. Ruan, Y. Hayashizaki, J. Harrow, M. Gerstein, T. Hubbard, A. Reymond, S.E. Antonarakis, G. Hannon, M.C. Giddings, Y. Ruan, B. Wold, P. Carninci, R. Guigo, and T.R. Gingeras. 2012. Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 489:101–108. doi:10.1038/nature11233.
- Dolfini, D., R. Gatta, and R. Mantovani. 2012. NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47:29–49. doi:10.3109/10409238.2011.628970.
- Dolfini, D., F. Zambelli, G. Pavesi, and R. Mantovani. 2009. A perspective of promoter architecture from the CCAAT box. *Cell Cycle*. 4127–4137. doi:10.4161/cc.8.24.10240.
- Dolfini, D., F. Zambelli, M. Pedrazzoli, R. Mantovani, and G. Pavesi. 2016. A high definition look at the NF-Y regulome reveals genome-wide associations with selected transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 23:gkw096. doi:10.1093/nar/gkw096.
- Duszczuk, M.M., A. Wutz, V. Rybin, and M. Sattler. 2011. The Xist RNA A-repeat comprises a novel AUCG tetraloop fold and a platform for multimerization. *Rna*. 17:1973–1982. doi:10.1261/rna.2747411.
- Faghihi, M.A., F. Modarresi, A.M. Khalil, D.E. Wood, B.G. Sahagan, T.E. Morgan, C.E. Finch, G. St Laurent, P.J. Kenny, and C. Wahlestedt. 2008. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat. Med.* 14:723–30. doi:10.1038/nm1784.
- Faghihi, M.A., M. Zhang, J. Huang, F. Modarresi, M.P. Van der Brug, M.A. Nalls, M.R. Cookson, G. St-Laurent, and C. Wahlestedt. 2010. Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biol.* 11:R56. doi:10.1186/gb-2010-11-5-r56.
- Farina, A., I. Manni, G. Fontemaggi, M. Tiainen, C. Cenciarelli, M. Bellorini, R. Mantovani, A. Sacchi, and G. Piaggio. 1999. Down-regulation of cyclin B1 gene transcription in terminally differentiated skeletal muscle cells is associated with loss of functional CCAAT-binding NF-Y complex. *Oncogene*. 18:2818–2827. doi:10.1038/sj.onc.1202472.
- Gabler, S., H. Schütt, P. Groitl, H. Wolf, T. Shenk, and T. Dobner. 1998. E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic

- transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol.* 72:7960–71.
- Garneau, D., T. Revil, J.F. Fiset, and B. Chabot. 2005. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J. Biol. Chem.* 280:22641–22650. doi:10.1074/jbc.M501070200.
- Gong, C., and L.E. Maquat. 2011. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature.* 470:284–288. doi:10.1038/nature09701.
- Gupta, R. a, N. Shah, K.C. Wang, J. Kim, H.M. Horlings, D.J. Wong, M.-C. Tsai, T. Hung, P. Argani, J.L. Rinn, Y. Wang, P. Brzoska, B. Kong, R. Li, R.B. West, M.J. van de Vijver, S. Sukumar, and H.Y. Chang. 2010. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 464:1071–6. doi:10.1038/nature08975.
- Gurova, K. V, O.W. Rokhlin, A. V Budanov, C. Cells, L.G. Burdelya, P.M. Chumakov, M.B. Cohen, and A. V Gudkov. 2003. Cooperation of Two Mutant p53 Alleles Contributes to Fas Resistance of Prostate Carcinoma Cells Cooperation of Two Mutant p53 Alleles Contributes to Fas Resistance of Prostate. *Cancer Res.* 63:2905–2912.
- Guttman, M., I. Amit, M. Garber, C. French, M.F. Lin, D. Feldser, M. Huarte, O. Zuk, B.W. Carey, J.P. Cassady, M.N. Cabili, R. Jaenisch, T.S. Mikkelsen, T. Jacks, N. Hacohen, B.E. Bernstein, M. Kellis, A. Regev, J.L. Rinn, and E.S. Lander. 2009. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature.* 458:223–7. doi:10.1038/nature07672.
- Guttman, M., and J.L. Rinn. 2012. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature.* 482:339–46. doi:10.1038/nature10887.
- Hahn, B., O.H. Cho, J.E. Kim, Y.K. Kim, J.H. Kim, Y.L. Oh, and S.K. Jang. 1998. Polypyrimidine tract-binding protein interacts with HnRNP L. *FEBS Lett.* 425:401–406. doi:10.1016/S0014-5793(98)00269-5.
- Hahn, M.W., and G.A. Wray. 2002. The g-value paradox. *Evol. Dev.* 4:73–75. doi:10.1046/j.1525-142X.2002.01069.x.
- Hamilton, M.J., M.D. Young, S. Sauer, and E. Martinez. 2015. The interplay of long non-coding RNAs and MYC in cancer. *AIMS Biophys.* 2:794–809. doi:10.3934/biophy.2015.4.794.
- Han, L., E. Zhang, D. Yin, R. Kong, T. Xu, W. Chen, R. Xia, Y. Shu, and W. De. 2015. Low expression of long noncoding RNA PANDAR predicts a poor prognosis of non-small cell lung cancer and affects cell apoptosis by regulating Bcl-2. *Cell Death Dis.* 6:e1665. doi:10.1038/cddis.2015.30.
- van Heesch, S., M. van Iterson, J. Jacobi, S. Boymans, P.B. Essers, E. de Bruijn, W. Hao, A.W.

- Macinnes, E. Cuppen, and M. Simonis. 2014. Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes. *Genome Biol.* 15:R6. doi:10.1186/gb-2014-15-1-r6.
- Hillier, L.W., a Coulson, J.I. Murray, Z.R. Bao, J.E. Sulston, and R.H. Waterston. 2005. Genomics in C-elegans: So many genes, such a little worm. *Genome Res.* 15:1651–1660. doi:10.1101/gr.3729105.
- Houseley, J., L. Rubbi, M. Grunstein, D. Tollervey, and M. Vogelauer. 2008. A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast GAL gene cluster. *Mol. Cell.* 32:685–95. doi:10.1016/j.molcel.2008.09.027.
- Hu, Q., C. Bhattacharya, and S.N. Maity. 2002. CCAAT binding factor (CBF) binding mediates cell cycle activation of topoisomerase II?: Conventional CBF activation domains are not required. *J. Biol. Chem.* 277:37191–37200. doi:10.1074/jbc.M205985200.
- Hu, W., J.R. Alvarez-Dominguez, and H.F. Lodish. 2012. Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs. *EMBO Rep.* 24–26. doi:10.1038/embor.2012.145.
- Huang, B., and R. Zhang. 2014. Regulatory non-coding RNAs: revolutionizing the RNA world. *Mol. Biol. Rep.* doi:10.1007/s11033-014-3259-6.
- Huarte, M., M. Guttman, D. Feldser, M. Garber, M.J. Koziol, D. Kenzelmann-Broz, A.M. Khalil, O. Zuk, I. Amit, M. Rabani, L.D. Attardi, A. Regev, E.S. Lander, T. Jacks, and J.L. Rinn. 2010. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell.* 142:409–419. doi:10.1016/j.cell.2010.06.040.
- Huarte, M., and J.L. Rinn. 2010. Large non-coding RNAs: missing links in cancer? *Hum. Mol. Genet.* 19:R152–61. doi:10.1093/hmg/ddq353.
- Hudson, W.H., and E.A. Ortlund. 2014. The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15:749–60. doi:10.1038/nrm3884.
- Hudson, W.H., M.R. Pickard, I.M.S. de Vera, E.G. Kuiper, M. Mourtada-Maarabouni, G.L. Conn, D.J. Kojetin, G.T. Williams, and E.A. Ortlund. 2014. Conserved sequence-specific lincRNA-steroid receptor interactions drive transcriptional repression and direct cell fate. *Nat. Commun.* 5:5395. doi:10.1038/ncomms6395.
- Hung, T., Y. Wang, M.F. Lin, A.K. Koegel, Y. Kotake, G.D. Grant, H.M. Horlings, N. Shah, C. Umbricht, P. Wang, B. Kong, A. Langerød, A.-L. Børresen-Dale, S.K. Kim, M. van de Vijver, S. Sukumar, M.L. Whitfield, M. Kellis, Y. Xiong, D.J. Wong, and H.Y. Chang. 2011. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat. Genet.* 43:621–9. doi:10.1038/ng.848.

- Imbriano, C., A. Gurtner, F. Cocchiarella, S. Di Agostino, V. Basile, M. Gostissa, M. Dobbstein, G. Del Sal, G. Piaggio, R. Mantovani, B. Animale, and O. Sperimentale. 2005. Direct p53 Transcriptional Repression: In Vivo Analysis of CCAAT-Containing G 2 / M Promoters. *Society*. 25:3737–3751. doi:10.1128/MCB.25.9.3737.
- Ji, P., S. Diederichs, W. Wang, S. Boing, R. Metzger, P.M. Schneider, N. Tidow, B. Brandt, H. Buerger, E. Bulk, M. Thomas, W.E. Berdel, H. Serve, and C. Muller-Tidow. 2003. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 22:6087–6097. doi:10.1038/sj.onc.1206928.
- Johnsson, P., L. Lipovich, D. Grandér, and K. V Morris. 2014. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochim Biophys Acta*. 1840:1063–1071. doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.035.
- Jones, S. 2001. Protein-RNA interactions: a structural analysis. *Nucleic Acids Res*. 29:943–954. doi:10.1093/nar/29.4.943.
- Kaneko, S., G. Li, J. Son, C.F. Xu, R. Margueron, T.A. Neubert, and D. Reinberg. 2010. Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev*. 24:2615–2620. doi:10.1101/gad.1983810.
- Kapranov, P., J. Cheng, S. Dike, N. David A, D. Radharani, Tw. Aaron, P.F. Stadler, J. Hertel, J. Hackermüller, I.L. Hofacker, I. Bell, E. Cheung, J. Drenkow, E. Dumais, S. Patel, G. Helt, M. Ganesh, S. Ghosh, A. Piccolboni, V. Sementchenko, H. Tammana, and T.R. Gingeras. 2007. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science (80-.)*. 316:1484–1488. doi:10.1126/science.1138341.
- Kogo, R., T. Shimamura, K. Mimori, K. Kawahara, S. Imoto, T. Sudo, F. Tanaka, K. Shibata, A. Suzuki, S. Komune, S. Miyano, and M. Mori. 2011. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res*. 71:6320–6. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1021.
- Kotake, Y., M. Naemura, K. Kitagawa, H. Niida, T. Tsunoda, S. Shirasawa, and M. Kitagawa. 2014. Oncogenic Ras influences the expression of multiple lncRNAs. *Cytotechnology*. doi:10.1007/s10616-014-9834-9.
- Lander, E.S., and E. Al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860–921. doi:10.1038/35057062.
- Lee, J.-J., B.C. Kim, M.-J. Park, Y.-S. Lee, Y.-N. Kim, B.L. Lee, and J.-S. Lee. 2011. PTEN status switches cell fate between premature senescence and apoptosis in glioma exposed to ionizing radiation. *Cell Death Differ*. 18:666–77. doi:10.1038/cdd.2010.139.

- Lennox, K.A., and M.A. Behlke. 2015. Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 44:1–15. doi:10.1093/nar/gkv1206.
- Llorian, M., S. Schwartz, T. a Clark, D. Hollander, L.-Y. Tan, R. Spellman, A. Gordon, A.C. Schweitzer, P. de la Grange, G. Ast, and C.W.J. Smith. 2010. Position-dependent alternative splicing activity revealed by global profiling of alternative splicing events regulated by PTB. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17:1114–1123. doi:10.1038/nsmb.1881.
- Lunde, B.M., C. Moore, and G. Varani. 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:479–90. doi:10.1038/nrm2178.
- Luo, J., B. Ren, S. Keryanov, G.C. Tseng, U.N.M. Rao, S.P. Monga, S. Strom, A.J. Demetris, M. Nalesnik, P. Yan, S. Ranganathan, and G.K. Michalopoulos. 2006. Transcriptomic and Genomic Analysis of Human Hepatocellular Carcinomas and Hepatoblastomas. *Hepatology.* 44:1012–1024. doi:10.1002/hep.21328.
- Ma, P., T. Xu, M. Huang, and Y. Shu. 2016. Increased expression of LncRNA PANDAR predicts a poor prognosis in gastric cancer. *Biomed. Pharmacother.* 78:172–176. doi:10.1016/j.biopha.2016.01.025.
- Mackay, J.P., J. Font, and D.J. Segal. 2011. The prospects for designer single-stranded RNA-binding proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:256–261. doi:10.1038/nsmb0411-516e.
- Mantovani, R. 1998. A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res.* 26:1135–43. doi:10.1093/nar/26.5.1135.
- Mantovani, R. 1999. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene.* 239:15–27. doi:10.1016/S0378-1119(99)00368-6.
- Matuoka, K., and K. Yu Chen. 1999. Nuclear factor Y (NF-Y) and cellular senescence. *Exp. Cell Res.* 253:365–371. doi:10.1006/excr.1999.4605rS0014-4827(99)94605-0 [pii].
- McHugh, C.A., C.-K. Chen, A. Chow, C.F. Surka, C. Tran, P. McDonel, A. Pandya-Jones, M. Blanco, C. Burghard, A. Moradian, M.J. Sweredoski, A.A. Shishkin, J. Su, E.S. Lander, S. Hess, K. Plath, and M. Guttman. 2015. The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature.* 521:232–236. doi:10.1038/nature14443.
- Mercer, T.R., M.E. Dinger, and J.S. Mattick. 2009. Insights Into Functions. *Nat. Rev. Genet.* 10:155–159. doi:10.1038/nrg2521.
- Meredith, A.-M., and C.R. Dass. 2016. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.* 68:729–41. doi:10.1111/jphp.12539.

- Minotti, G. 2004. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56:185–229. doi:10.1124/pr.56.2.6.
- Monie, T.P., H. Hernandez, C. V Robinson, P. Simpson, S. Matthews, and S. Curry. 2005. The polypyrimidine tract binding protein is a monomer. *RNA*. 11:1803–8. doi:10.1261/rna.2214405.
- Nagalakshmi, U., Z. Wang, K. Waern, C. Shou, D. Rha, M. Gerstein, and M. Snyder. 2008. The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. *Science* (80-.). 320:1344–1349. doi:10.1126/science.1158441.
- Naganuma, T., S. Nakagawa, A. Tanigawa, Y.F. Sasaki, N. Goshima, and T. Hirose. 2012. Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *EMBO J.* 31:4020–4034. doi:10.1038/emboj.2012.251.
- Nagasaki, H., M. Arita, T. Nishizawa, M. Suwa, and O. Gotoh. 2005. Species-specific variation of alternative splicing and transcriptional initiation in six eukaryotes. *Gene*. 364:53–62. doi:10.1016/j.gene.2005.07.027.
- Nardini, M., N. Gnesutta, G. Donati, R. Gatta, C. Forni, A. Fossati, C. Vornrhein, D. Moras, C. Romier, M. Bolognesi, and R. Mantovani. 2013. Sequence-Specific Transcription Factor NF-Y Displays Histone-like DNA Binding and H2B-like Ubiquitination. *Cell*. 152:132–43. doi:10.1016/j.cell.2012.11.047.
- Neguembor, M.V., M. Jothi, and D. Gabellini. 2014. Long noncoding RNAs, emerging players in muscle differentiation and disease. *Skelet. Muscle*. 4:8. doi:10.1186/2044-5040-4-8.
- Niazi, F., and S. Valadkhan. 2012. Computational analysis of functional long noncoding RNAs reveals lack of peptide-coding capacity and parallels with 3' UTRs. *RNA*. 18:825–43. doi:10.1261/rna.029520.111.
- Oldfield, A.J., P. Yang, A.E. Conway, S. Cinghu, J.M. Freudenberg, S. Yellaboina, and R. Jothi. 2014. Histone-Fold Domain Protein NF-Y Promotes Chromatin Accessibility for Cell Type-Specific Master Transcription Factors. *Mol. Cell*. 55:708–722. doi:10.1016/j.molcel.2014.07.005.
- Olive, K.P., D.A. Tuveson, Z.C. Ruhe, B. Yin, N.A. Willis, R.T. Bronson, D. Crowley, T. Jacks, and C. Chase. 2004. Mutant p53 Gain of Function in Two Mouse Models of Li-Fraumeni Syndrome. *Cell*. 119:847–860. doi:10.1016/j.cell.2004.11.004.
- Paronetto, M.P., T. Achsel, A. Massiello, C.E. Chalfant, and C. Sette. 2007. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *J. Cell Biol.* 176:929–939. doi:10.1083/jcb.200701005.
- Peng, W., and H. Fan. 2015. Long non-coding RNA PANDAR correlates with poor prognosis and promotes tumorigenesis in hepatocellular carcinoma. *Biomed. Pharmacother.* 72:113–118.

doi:10.1016/j.biopha.2015.04.014.

- Pérez, I., J.G. McAfee, and J.G. Patton. 1997. Multiple RRM's contribute to RNA binding specificity and affinity for polypyrimidine tract binding protein. *Biochemistry*. 36:11881–11890. doi:10.1021/bi9711745.
- Poliseno, L., L. Salmena, J. Zhang, B. Carver, W.J. Haveman, and P.P. Pandolfi. 2010. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*. 465:1033–8. doi:10.1038/nature09144.
- Ponting, C.P., P.L. Oliver, and W. Reik. 2009. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell*. 136:629–641. doi:10.1016/j.cell.2009.02.006.
- Pratt, K. 2012. Interaction Properties of hnRNP-U Family Proteins. *Univ. Birmingham*. Thesis.
- Puvvula, P.K., R.D. Desetty, P. Pineau, A. Marchio, A. Moon, A. Dejean, and O. Bischof. 2014. Long noncoding RNA PANDA and scaffold-attachment-factor SAFA control senescence entry and exit. *Nat. Commun.* 5:5323. doi:10.1038/ncomms6323.
- Qi, P., and X. Du. 2012. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine. *Mod. Pathol.* 1–11. doi:10.1038/modpathol.2012.160.
- Ramos, A.D., R.E. Andersen, S.J. Liu, T.J. Nowakowski, S.J. Hong, C.C. Gertz, R.D. Salinas, H. Zarabi, A.R. Kriegstein, and D.A. Lim. 2015. The long noncoding RNA Pnky regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 16:439–447. doi:10.1016/j.stem.2015.02.007.
- Reeves, M.B., A.A. Davies, B.P. McSharry, G.W. Wilkinson, and J.H. Sinclair. 2007. Complex I binding by a virally encoded RNA regulates mitochondria-induced cell death. *Science*. 316:1345–8. doi:10.1126/science.1142984.
- Revil, T., J. Pelletier, J. Toutant, A. Cloutier, and B. Chabot. 2009. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. *J. Biol. Chem.* 284:21458–21467. doi:10.1074/jbc.M109.019711.
- Romier, C., F. Cocchiarella, R. Mantovani, and D. Moras. 2003. The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J. Biol. Chem.* 278:1336–45. doi:10.1074/jbc.M209635200.
- Sang, Y., J. Tang, S. Li, L. Li, X. Tang, C. Cheng, Y. Luo, X. Qian, L.-M. Deng, L. Liu, and X.-B. Lv. 2016. LncRNA PANDAR regulates the G1/S transition of breast cancer cells by suppressing p16INK4A expression. *Sci. Rep.* 6:22366. doi:10.1038/srep22366.
- Saulière, J., A. Sureau, A. Expert-Bezançon, and J. Marie. 2006. The polypyrimidine tract binding

- protein (PTB) represses splicing of exon 6B from the beta-tropomyosin pre-mRNA by directly interfering with the binding of the U2AF65 subunit. *Mol. Cell. Biol.* 26:8755–69. doi:10.1128/MCB.00893-06.
- Schmidt, L.H., T. Spieker, S. Koschmieder, S. Schäffers, J. Humberg, D. Jungen, E. Bulk, A. Hascher, D. Wittmer, A. Marra, L. Hillejan, K. Wiebe, W.E. Berdel, R. Wiewrodt, and C. Muller-Tidow. 2011. The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth. *J. Thorac. Oncol.* 6:1984–92. doi:10.1097/JTO.0b013e3182307eac.
- Schor, I.E., D. Llères, G.J. Risso, A. Pawellek, J. Ule, A.I. Lamond, and A.R. Kornblihtt. 2012. Perturbation of Chromatin Structure Globally Affects Localization and Recruitment of Splicing Factors. *PLoS One*. 7. doi:10.1371/journal.pone.0048084.
- Sharma, V., S. Khurana, N. Kubben, K. Abdelmohsen, P. Oberdoerffer, M. Gorospe, and T. Misteli. 2015. A BRCA 1 -interacting lncRNA regulates homologous recombination. *EMBO Rep.* 16:1–15. doi:10.15252/embr.201540437.
- Singh, R., J. Valcarcel, and M.R. Green. 1995. Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science* (80-.). 268:1173–1176. doi:10.1126/science.7761834.
- Somarowthu, S., M. Legiewicz, I. Chill?n, M. Marcia, F. Liu, and A.M. Pyle. 2015. HOTAIR Forms an Intricate and Modular Secondary Structure. *Mol. Cell.* 58:353–361. doi:10.1016/j.molcel.2015.03.006.
- Song, Y.S., B.Y. Lee, and E.S. Hwang. 2005. Dinstinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis. *Mech. Ageing Dev.* 126:580–590. doi:10.1016/j.mad.2004.11.008.
- Sotillo, E., and A. Thomas-Tikhonenko. 2011. The long reach of noncoding RNAs. *Nat. Genet.* 43:616–7. doi:10.1038/ng.870.
- Soussi, T., and G. Lozano. 2005. P53 Mutation Heterogeneity in Cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331:834–842. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.190.
- Spitzer, J., M. Hafner, M. Landthaler, M. Ascano, T. Farazi, G. Wardle, J. Nusbaum, M. Khorshid, L. Burger, M. Zavolan, and T. Tuschl. 2014. PAR-CLIP (Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation): a Step-By-Step Protocol to the Transcriptome-Wide Identification of Binding Sites of RNA-Binding Proteins. *Methods Enzym.* 539:1–47. doi:10.1016/B978-0-12-420120-0.00008-6.PAR-CLIP.
- Swiezewski, S., F. Liu, A. Magusin, and C. Dean. 2009. Cold-induced silencing by long antisense

- transcripts of an Arabidopsis Polycomb target. *Nature*. 462:799–802. doi:10.1038/nature08618.
- Taft, R.J., M. Pheasant, and J.S. Mattick. 2007. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays*. 29:288–299. doi:10.1002/bies.20544.
- Tang, J.Y., J.C. Lee, Y.T. Chang, M.F. Hou, H.W. Huang, C.C. Liaw, and H.W. Chang. 2013. Long noncoding RNAs-related diseases, cancers, and drugs. *Sci. World J.* 2013. doi:10.1155/2013/943539.
- Torosyan, Y., a Dobi, M. Glasman, K. Mezhevaya, S. Naga, W. Huang, C. Paweletz, X. Leighton, H.B. Pollard, and M. Srivastava. 2010. Role of multi-hnRNP nuclear complex in regulation of tumor suppressor ANXA7 in prostate cancer cells. *Oncogene*. 29:2457–2466. doi:10.1038/onc.2010.2.
- Tripathi, V., Z. Shen, A. Chakraborty, S. Giri, S.M. Freier, X. Wu, Y. Zhang, M. Gorospe, S.G. Prasanth, A. Lal, and K. V Prasanth. 2013. Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. *PLoS Genet*. 9:e1003368. doi:10.1371/journal.pgen.1003368.
- Tsai, M.-C., O. Manor, Y. Wan, N. Mosammaparast, J.K. Wang, F. Lan, Y. Shi, E. Segal, and H.Y. Chang. 2010. Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes. *Science (80-.)*. 329:689–693. doi:10.1126/science.1192002.
- Venter, J.C., M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, J.D. Gocayne, P. Amanatides, R.M. Ballew, D.H. Huson, J.R. Wortman, Q. Zhang, C.D. Kodira, X.H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P.D. Thomas, J. Zhang, G.L.G. Miklos, C. Nelson, S. Broder, A.G. Clark, J. Nadeau, V.A. McKusick, N. Zinder, A.J. Levine, R.J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reiner, K. Remington, J. Abu-Threide, E. Beasle, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturved, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A.E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gon, Z. Gu, P. Guan, T.J. Heiman, M.E. Higgins, R.-R. Ji, Z. Ke, K.A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V Merkulov, N. Milshina, H.M. Moore, A.K. Naik, V.A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D.B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z.Y. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M.-H. Wei, R. Wides, et al. 2001. The sequence of the human genome. *Sci. (Washington, DC, United States)*. 291:1304–1351. doi:10.1126/science.1058040.
- Verhaegh, G.W., L. Verkleij, S.H.H.M. Vermeulen, M. den Heijer, J.A. Witjes, and L.A. Kiemeney. 2008. Polymorphisms in the H19 Gene and the Risk of Bladder Cancer. *Eur. Urol.* 54:1118–1126. doi:10.1016/j.eururo.2008.01.060.

- Vousden, K.H., and D.P. Lane. 2007. P53 in Health and Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:275–83. doi:10.1038/nrm2147.
- Wahl, M.C., C.L. Will, and R. Lührmann. 2009. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell.* 136:701–718. doi:10.1016/j.cell.2009.02.009.
- Wang, K.C., and H.Y. Chang. 2011. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell.* 43:904–14. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.018.
- Wang, K.C., Y.W. Yang, B. Liu, A. Sanyal, R. Corces-Zimmerman, Y. Chen, B.R. Lajoie, A. Protacio, R.A. Flynn, R.A. Gupta, J. Wysocka, M. Lei, J. Dekker, J.A. Helms, and H.Y. Chang. 2011. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature.* 472:120–4. doi:10.1038/nature09819.
- Wang, X., S. Arai, X. Song, D. Reichart, K. Du, G. Pascual, P. Tempst, M.G. Rosenfeld, C.K. Glass, and R. Kurokawa. 2008. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature.* 454:126–30. doi:10.1038/nature06992.
- Wapinski, O., and H.Y. Chang. 2011. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol.* 21:354–61. doi:10.1016/j.tcb.2011.04.001.
- Ward, M., C. McEwan, J.D. Mills, and M. Janitz. 2015. Conservation and tissue-specific transcription patterns of long noncoding RNAs. *J. Hum. Transcr.* 1:2–9. doi:10.3109/23324015.2015.1077591.
- Watson, J.D., and F.H. Crick. 1953. Molecular Structure of nucleic acids; a structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature.* 171:737–738.
- Whisenant, T.C., E.R. Peralta, L.D. Aarreberg, N.J. Gao, S.R. Head, P. Ordoukhanian, J.R. Williamson, and D.R. Salomon. 2015. The Activation-Induced Assembly of an RNA/Protein Interactome Centered on the Splicing Factor U2AF2 Regulates Gene Expression in Human CD4 T Cells. *PLoS One.* 10:e0144409. doi:10.1371/journal.pone.0144409.
- Wilusz, J.E. 2016. Long noncoding RNAs: Re-writing dogmas of RNA processing and stability. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1859:128–138. doi:10.1016/j.bbagr.2015.06.003.
- Wood, E.J., K. Chin-Inmanu, H. Jia, and L. Lipovich. 2013. Sense-antisense gene pairs: Sequence, transcription, and structure are not conserved between human and mouse. *Front. Genet.* 4:1–12. doi:10.3389/fgene.2013.00183.
- Xiao, R., P. Tang, B. Yang, J. Huang, Y. Zhou, C. Shao, H. Li, H. Sun, Y. Zhang, and X.D. Fu. 2012. Nuclear Matrix Factor hnRNP U/SAF-A Exerts a Global Control of Alternative Splicing by Regulating U2 snRNP Maturation. *Mol. Cell.* 45:656–668. doi:10.1016/j.molcel.2012.01.009.

- Xue, Y., Y. Zhou, T. Wu, T. Zhu, X. Ji, and Y. Kwon. 2009. Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping. *Mol cell*. 36:996–1006. doi:10.1016/j.molcel.2009.12.003.Genome-wide.
- Yang, F., L. Zhang, X. Huo, J. Yuan, D. Xu, S. Yuan, N. Zhu, W. Zhou, G. Yang, Y. Wang, J. Shang, C. Gao, F. Zhang, F. Wang, and S. Sun. 2011. Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans. *Hepatology*. 54:1679–89. doi:10.1002/hep.24563.
- Yun, J., H.-D. Chae, T.-S. Choi, E.-H. Kim, Y.-J. Bang, J. Chung, K.-S. Choi, R. Mantovani, and D.Y. Shin. 2003. Cdk2-dependent Phosphorylation of the NF-Y Transcription Factor and Its Involvement in the p53-p21 Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 278:36966–36972. doi:10.1074/jbc.M305178200.
- Zamore, P.D., J.G. Patton, and M.R. Green. 1992. Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF. *Nature*. 355:242–244. doi:10.1038/355242a0.
- Zhan, Y., J. Lin, Y. Liu, M. Chen, X. Chen, C. Zhuang, L. Liu, W. Xu, Z. Chen, A. He, Q. Zhang, X. Sun, G. Zhao, and W. Huang. 2016. Up-regulation of long non-coding RNA PANDAR is associated with poor prognosis and promotes tumorigenesis in bladder cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 35:83. doi:10.1186/s13046-016-0354-7.
- Zhang, K., X. Sun, X. Zhou, L. Han, L. Chen, Z. Shi, A. Zhang, M. Ye, Q. Wang, C. Liu, J. Wei, Y. Ren, J. Yang, J. Zhang, P. Pu, M. Li, and C. Kang. 2015a. Long non-coding RNA HOTAIR promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner. *Oncotarget*. 6:537–46. doi:10.18632/oncotarget.2681.
- Zhang, Y., Y. Gao, G. Zhang, S. Huang, Z. Dong, C. Kong, D. Su, J. Du, S. Zhu, Q. Liang, J. Zhang, J. Lu, and B. Huang. 2011. DNMT3a plays a role in switches between doxorubicin-induced senescence and apoptosis of colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*. 128:551–561. doi:10.1002/ijc.25365.
- Zhang, Y., T. Wang, H. Huang, W. Li, X. Cheng, and J. Yang. 2015b. Human MALAT-1 long non-coding RNA is overexpressed in cervical cancer metastasis and promotes cell proliferation , invasion and migration. *JBUON*. 20:1497–1503.
- Zhao, J., T.K. Ohsumi, J.T. Kung, Y. Ogawa, D.J. Grau, K. Sarma, J.J. Song, R.E. Kingston, M. Borowsky, and J.T. Lee. 2010. Genome-wide Identification of Polycomb-Associated RNAs by RIP-seq. *Mol. Cell*. 40:939–953. doi:10.1016/j.molcel.2010.12.011.
- Zhu, J., H. Fu, Y. Wu, and X. Zheng. 2013. Function of lncRNAs and approaches to lncRNA-protein interactions. *Sci. China. Life Sci*. 56:876–85. doi:10.1007/s11427-013-4553-6.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Sven Hennig für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Darüber hinaus möchte ich mich für das vielschichtige und spannende Thema, den wissenschaftlichen Freiraum und die anregenden Diskussionen bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Verena Jendrossek für die Übernahme des Erstgutachtens und auch für die Zeit meiner Masterarbeit, die ich in Ihrer Arbeitsgruppe anfertigen durfte. Es war eine tolle Zeit, in der ich meine Fähigkeiten erweitern konnte, die zu meiner Promotion beigetragen haben. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Alexander Schramm für die freundliche Übernahme meines Zweitgutachtens bedanken.

Ein weiterer Dank gilt meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Tom Grossmann, M.Sc. Laura Dietrich (PNA-Synthese), Dr. Tanja Bange (SILAC), Dr. Jessica Hoell, Dr. Kebria Hezaveh und M.Sc. Andreas Klötgen (PAR-CLIP) für die vielfältigen Hilfestellungen. Ich möchte mich zusätzlich bei meinen stets motivierten und engagierten Bachelor- und Masterstudenten für die tolle Arbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt Hannah Cibis, Philine Hagel und Stefan Grote, deren Teilergebnisse in dieser Arbeit verwendet wurden. Außerdem möchte ich mich bei dem Team des Statistischen Beratungs- und Analyse-Zentrums der TU Dortmund für die statistische Hilfestellung der biologischen Triplikat-Berechnung bedanken.

Des Weiteren möchte ich meinen Arbeitskollegen für die tolle Arbeitsatmosphäre und wissenschaftlichen Hilfestellungen danken. Nicht nur auf wissenschaftlicher, sondern auch auf persönlicher Ebene war es eine schöne Zeit. Ich freue mich sehr, dass aus tollen Arbeitskollegen gute Freunde wurden.

Darüber hinaus möchte ich allen Personen bedanken, die mich während der verschiedenen Stationen meines Studiums und meiner Promotion begleitet haben. Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner besten Freundin, die stets für mich da waren und mich unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Josef Pospiech, der seit dem Abitur an meiner Seite ist und mich in allen Situationen und Entscheidungen unterstützt hat. Vielen Dank, dass es dich gibt und du immer an mich geglaubt hast.

10. Anhang

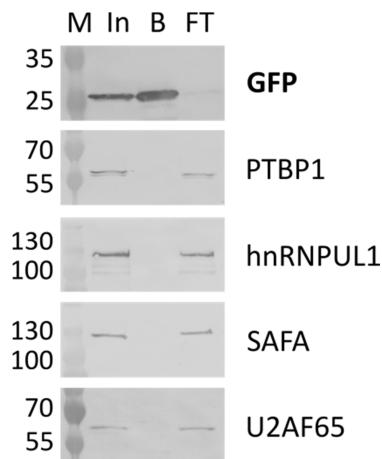


Abbildung 32: Western Blot Analyse der GFP-Kontrolle

Die Western Blot Analyse des Kontroll-GFP-Pull Downs aus wildtypischen U2OS Zellen (zu Abbildung 29) zeigt keine Interaktion mit den untersuchten Proteinen PTBP1, hnRNPUL1, SAFA und U2AF65. M: Marker [kDa], In: Input, B: Bound, FT: Durchfluss (Flowthrough)

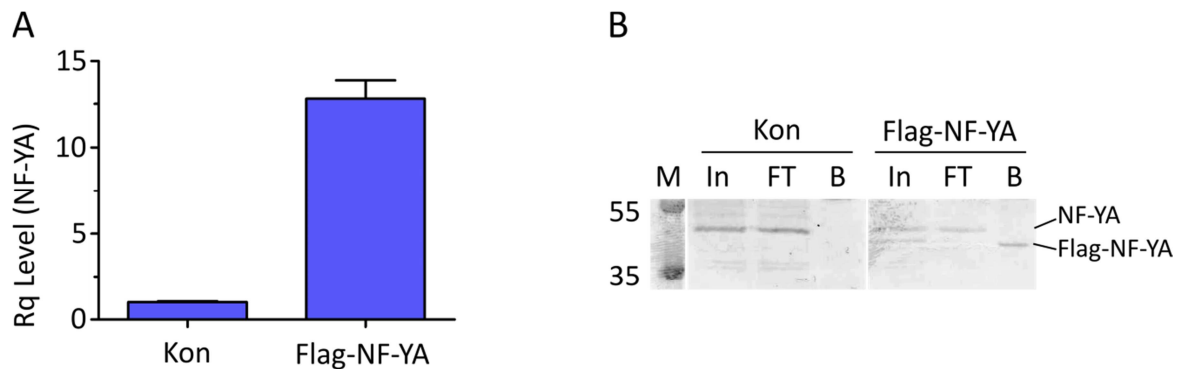


Abbildung 33: Stabile Flag-NF-YA U2OS Zelllinie

A) Die qPCR Analyse der Flag-NF-YA U2OS Zelllinie zeigt ein 12,5-fach erhöhtes *NF-YA* mRNA Level im Vergleich zu wildtypischen U2OS Zellen (*NF-YA/GAPDH*). B) Dargestellt ist die Western Blot Analyse eines FLAG-Pull Downs von wildtypischen und Flag-NF-YA U2OS Zellen. Der mit NF-YA Antikörper inkubierte Western Blot zeigt die spezifische Anreicherung von Flag-NF-YA aus der Flag-NF-YA Zelllinie. M: Marker [kDa], In: Input, FT: Flowthrough, B: Bound

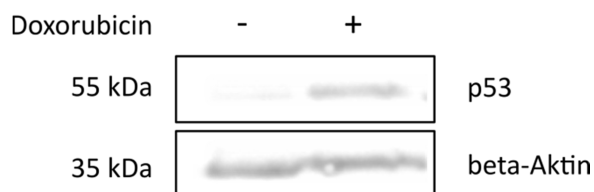


Abbildung 34: p53 Stabilisierung durch Doxorubicin-Behandlung

Dargestellt ist der Western Blot von wildtypischen U2OS Zellen nach 24-stündiger 200 ng/ml Doxorubicin-Behandlung. Die mit Doxorubicin-inkubierten Zellen (+) zeigen ein verstärktes p53 Proteinlevel im Vergleich zu nicht behandelten Zellen (-). Als Beladungskontrolle diente beta-Aktin.

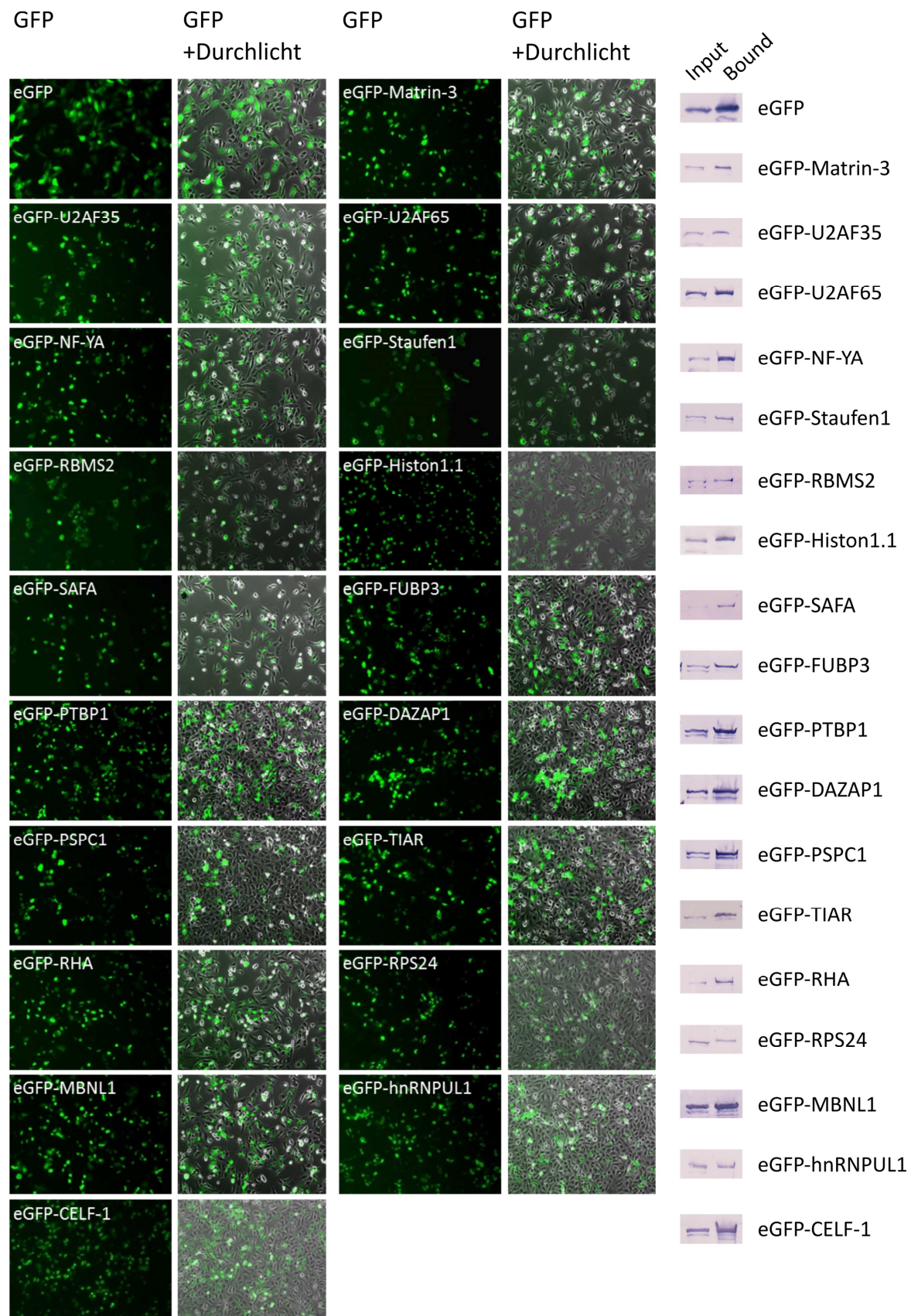
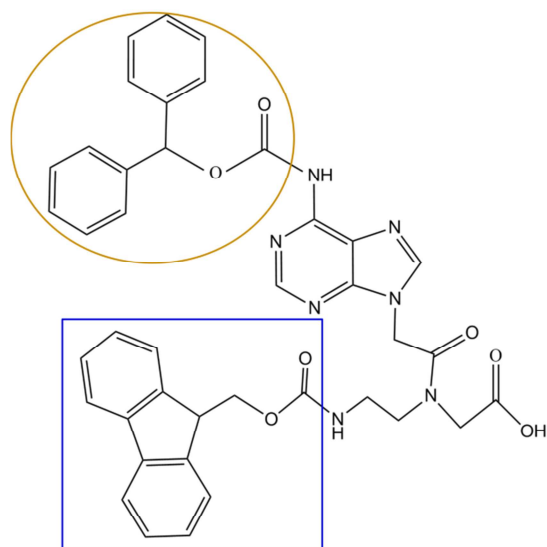


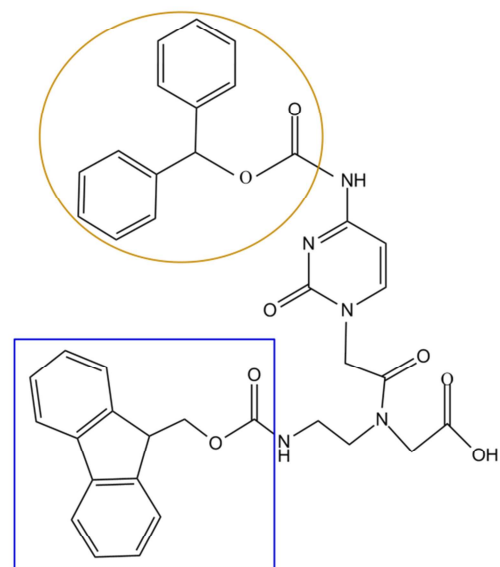
Abbildung 35: Transfektion und Western Blot Analyse der eGFP-Fusionsproteine

Dargestellt ist die Analyse der eGFP-Fusionsprotein Transfektionseffizienz nach 24 h in stabile *PANDAR-U2OS* Zellen und die zugehörigen GFP-Western Blots des GFP-Pull Downs. (Validierung der SILAC Kandidaten (Abbildung 27)).

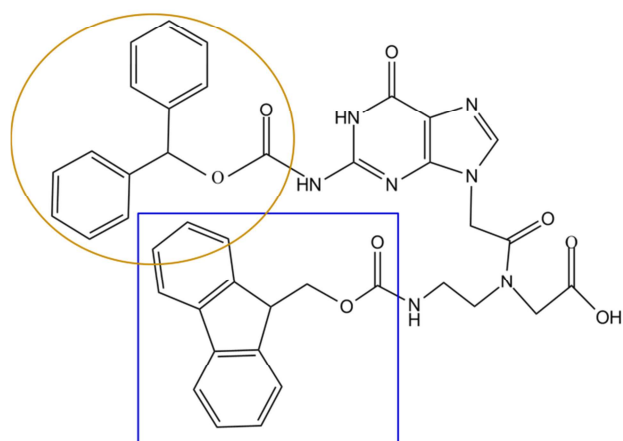
A Fmoc-A(Bhoc)-aeg-OH



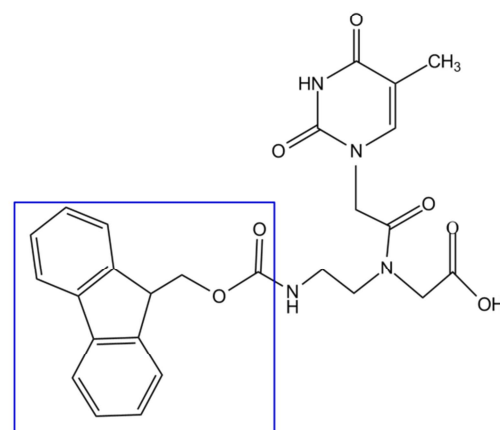
B Fmoc-C(Bhoc)-aeg-OH



C Fmoc-G(Bhoc)-aeg-OH



D Fmoc-T-aeg-OH

**Abbildung 36: PNA Bausteine**

Die PNA Bausteine bestehen aus der jeweiligen Base, dem 2-Aminoethylglycin (aeg), der Bhoc-Schutzgruppe (orange) zum Schützen der primären Amine (A, B, C) und der temporäre Fmoc-Schutzgruppe (blau).

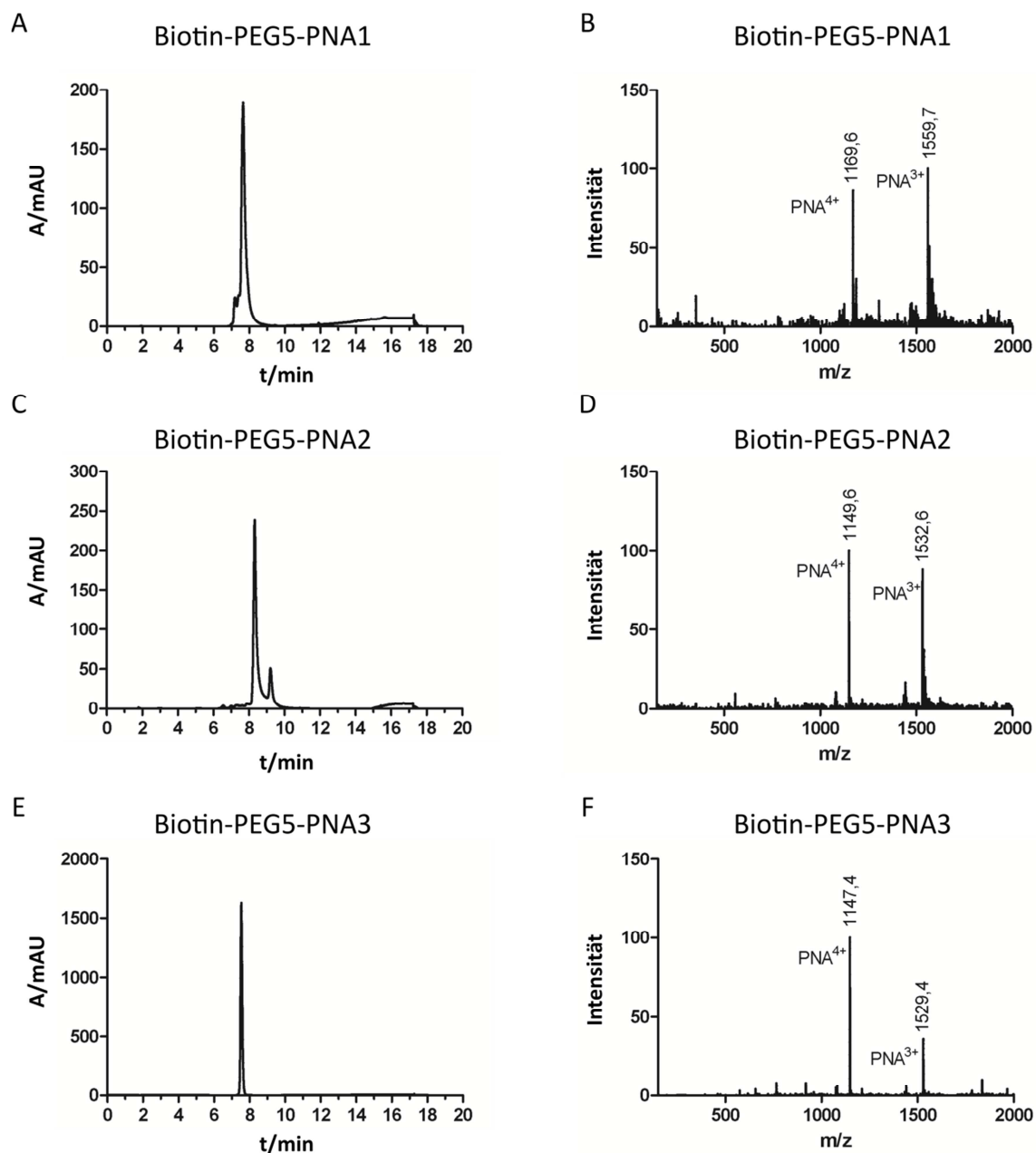


Abbildung 37: Aufreinigung der Biotin-PNAs

Dargestellt sind die Absorptionsmaxima mit zugehöriger Retentionszeit (A, C, E) und die zugehörigen Massen, welche anhand der mehrfach geladenen Ionen identifiziert werden können (B, D, F). Die Synthese und Aufreinigung der Biotin-PEG5-PNA2 (C, D) erfolgte durch Philine Hagel unter meiner Betreuung.

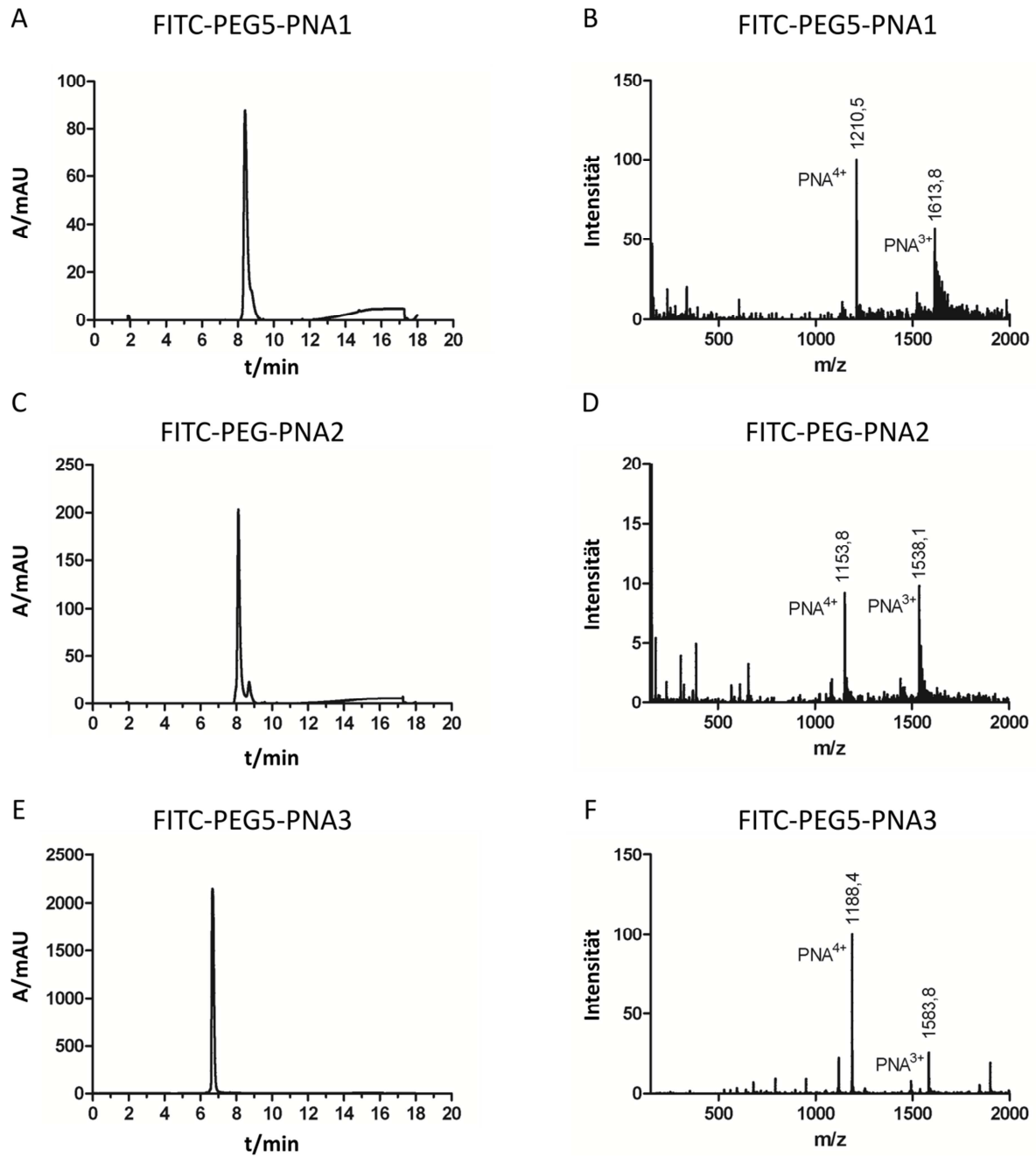


Abbildung 38: Aufreinigung der FITC-PNAs

Dargestellt sind die Absorptionsmaxima mit zugehöriger Retentionszeit (A, C, E) und die zugehörigen Massen, welche anhand der mehrfach geladenen Ionen identifiziert werden können (B, D, F).

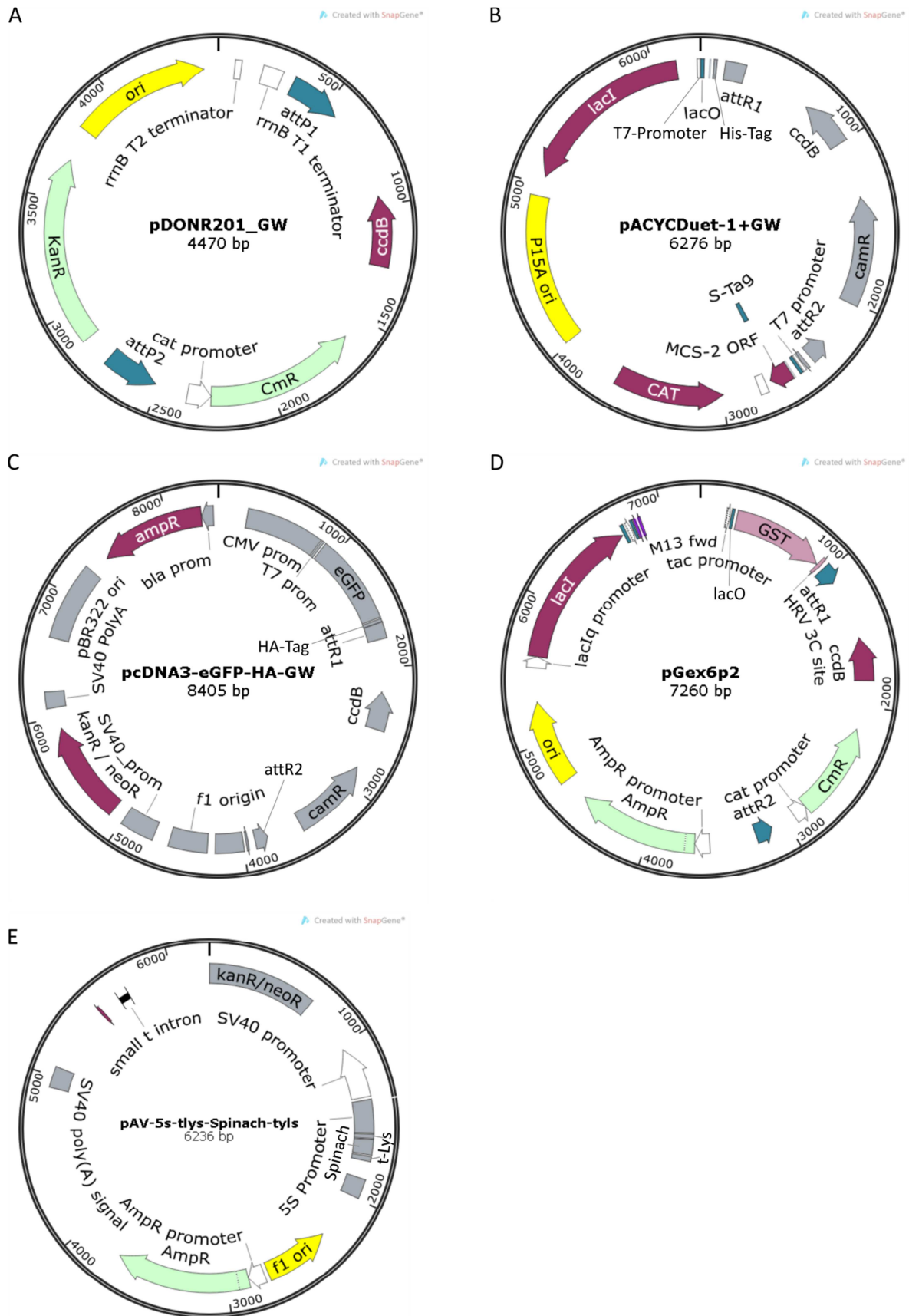


Abbildung 39: Plasmidkarten

A) pDONR201-Gateway (Entry Plasmid), B) pACYC-Duet-Gateway (Destination Plasmid), C) pcDNA3-eGFP-HA-Gateway (Destination Plasmid), D) pGex6p2, E) pAV-5s-t-Lys-Spinach-t-Lys

Tabelle 41: Datenbanknummern der klonierten Konstrukte

Gencode	Datenbanknr.	Proteinname
MATR3	P43243	Matrin-3
PTBP1	P26599	Polypyrimidine tract binding protein 1
DHX9	Q08211	ATP-dependent RNA helicase A
U2AF65	P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit
CELF1	Q96J87	CUGBP Elav-like family member 1
U2AF1	Q01081	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit
FUBP3	Q96I24	Far upstream element-binding protein 3
TIAL1	Q01085	Nucleolysin TIAR
MBNL1	Q9NR56	Muscleblind-like protein 1
PSPC1	Q8WXF1	Paraspeckle component 1
HTRA2	O43464	Serine protease HTRA2, mitochondrial
STAU1	O95793-3	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1
HIST1H1A	Q02539	Histone H1.1
RPS24	P62847	40S ribosomal protein S24
HNRNPUL1	Q9BUJ2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U- like protein 1
DAZAP1	Q96EP5	DAZ-associated protein 1
EIF2AK2	P19525	Interferon-induced, double-stranded RNA- activated protein kinase
HIST1H1E;HIST1H1D	P10412	Histone H1.4;Histone H1.3
LIG3	P49916	DNA ligase 3
RBMS2	Q15434	RNA-binding motif, single-stranded- interacting protein 2
HNRNPU	Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U- like protein 1, SAFA
NF-YA	P23511	Nuklear Transkription Faktor Y Untereinheit A
NF-YB	P25208	Nuklear Transkription Faktor Y Untereinheit B
NF-YC	Q13952	Nuklear Transkription Faktor Y Untereinheit C
Gencode	Datenbanknr.	Name
PANDAR	NR_109836.1	Promotor Of CDKN1A Antisense DNA Damage Activated RNA

Tabelle 42: Liste der verwendeten Klonierungsprimer

Primer	Sequenz (5' → 3')
NF-YA_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGAAAG TTCTGTTCCAGGGGCCCATTGGAGCAGTATACAGCA AACAGCAATAG
NF-YA_S347_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTAGG ACACTCGGATGATCTGTGTCATT
NF-YB_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGAAAG TTCTGTTCCAGGGGCCCATTGACAATGGATGGTGAC AGTTCTACAAC
NF-YB_S207_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCATG AAACTGAATTTGCTGAACACCAG
NF-YC_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGAAAG TTCTGTTCCAGGGGCCCATTGTCCACAGAAGGAGGA TTTGGTG
NF-YC_D335_I01_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCAGT CGCCGGTCACCTGGGG
NF-YA_E233_EcoRI_5'	GATCGAATTCTTGAAGAGCCTCTCTACGTGAATGCC AAAC
NF-YA_P303_EcoRI_3'	GATCGAATTCTTATGGATCCTGCATATGGGGACTAT CC
NF-YB S51_Pre_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGAAAG TTCTGTTCCAGGGGCCCAGTTTCAGAGAACAAGAT ATATATCTTCCAATAGC
NF-YB E143_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTACT CTCTGAATTTCTGAAGGTATAATTTTCAGAG
NF-YC M27_Pre_SLIC_EcoRV_5'	CATATGGCAGATCTCAATTGGATTTTGGAAAGTTCTG TTCCAGGGGCCCATTGGAAGAAATCCGGAATTTAAC AGT
NF-YC R120_SLIC_EcoRV_3'	CGTGGCCGGCCGATTTATCTTGGAACAATATCGATG AGAAAATCAAAC
PANDAR_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGAAAG TTCTGTTCCAGGGGCCCACGAATTCTTTCAGGAATG CCG
PANDAR_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTAGC AGTGGCTCACGCCT

Primer	Sequenz (5' → 3')
PANDAR_QC_G1150T_G1171A_5'	TGCAGACCATAAAAAGTTTCGAGTCTTGCCTGCCTTCAGAGGTGGTCCAGATA
PANDAR_QC_G1150T_G1171A_3'	TATCTGGACCACCTCTGAAGGCAGGCAAGACTCGA AACTTTTATGGTCTGCA
Xba1_PANDAR_5'	AGACTCTAGAACGAATTCTTTCAGGAATGCCG
Xba1_PANDAR_3'	AGACTCTAGAGCAGTGGCTCACGCCT
HindIII_T7_Prom_PANDAR_5'	GATCAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGACGAA TTCTTTCAGGAATGCCGC
HindIII_T7_Term_PANDAR_3'	GATCAAGCTTCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTA GAGGCCCCAAGGGGTATGCTAGCAGTGGCTCACG CCTGTAATCTC
PARCLIP PANDAR WT_5'	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTCAAACCTCGA CCTCAGTTGATCTGTCTGC
PARCLIP PANDAR WT_3'	GCAGACAGATCAACTGAGGTCGAGGTTTGACCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTC
PARCLIP PANDAR MUT1_5'	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTCAAACCTCGA CCTCAGTTGATACCGCTGC
PARCLIP PANDAR MUT1_3'	GCAGCGGTATCAACTGAGGTCGAGGTTTGACCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTC
PARCLIP PANDAR MUT2_5'	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCTCAGCTTTCCA GCTATCAATTTATCAAGA
PARCLIP PANDAR MUT2_3'	TCTTGATAAATTGATAGCTGGAAAGCTGAGCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTC
T7Prom_IVT_5'	GAAATTAATACGACTCACTATAGG
PARCLIP_PANDAR_Mut1_2_3'	GCAGCGGTATCACCTGAGGTCGAGGTTTGACCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTC

Primer	Sequenz (5' → 3')
PARCLIP_Kon1_3'	GCAGCCACACCTGGACCCGTCCTTCACCATCCTATA GTGAGTCGTATTAATTTTC
PARCLIP_Kon2_3'	TGCTCCTAGTGCCCTCGTGAGGTGTAGATGCCTATA GTGAGTCGTATTAATTTTC
RFC1_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGG ACATTCGGAAATTCTTTGGAGTAATAC
RFC1_K1148_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCATT TCTTCGAACTTTTTCCTTTTCCTTTTC
LIG3_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGT CTTTGGCTTTCAAGATCTTCTTTCC
LIG3_C1009_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTAGC AGGGAGCTACCAGTCTCCGT
RPS24_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGA ACGACACCGTAACTATCCGCAC
RPS24_E133_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTACT CCTTCGGCTTTTGGCCAGC
PTBP1_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGG ACGGCATTGTCCAGATATAGC
PTBP1_I531_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTAGA TGGTGGACTTGGAGAAGGAGACC
DHX9_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGG GTGACGTAAAAATTTTCTGTATGC
DHX9_Y1270_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTAAT AGCCGCCACCTCCTCTTCC
CELF1_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGG CCGCGGCGCC
CELF1_Y481_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCAGT AAGGCCGGTTGGCATCC
FUBP3_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGG CGGAGCTGGTGCAGG
FUBP3_Q572_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTACT GCTCCTGGCTGTGGGCC
TIAL1_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGA TGGAAGACGACGGGCAGC

Primer	Sequenz (5' → 3')
TIAL1_Q375_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCACT GTGTTTGGTAACTTGCCATACC
PSPC1_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGA TGTTAAGAGGAAACCTGAAGCAAGTG
PSPC1_Y523_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTAAT ATCTACGACGCTTATTAGGGCCTTCA
STAU1_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGT CTCAAGTTCAAGTGCAAGTTCAGAAC
STAU1_C577_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCAGC ACCTCCCACACACAGACAT
HIST1H1A_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGT CTGAAACAGTGCCTCCCGC
HIST1H1A_K215_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTACT TTTTCTTGGGTGCCGCTTTC
HNRNPUL1_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGG ATGTGCGCCGTCTGAAG
HNRNPUL1_Q856_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTACT GTGTACTTGTGCCACCCTGTGT
DAZAP1_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGA ACAACCTCGGGCGCCG
DAZAP1_R407_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTAGC GTCGGTAGGGGTGGAACC
EIF2AK2_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGG CTGGTGATCTTTCAGCAGGT
EIF2AK2_C551_GW_2'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTAAC ATGTGTGTCGTTCATTTTTCTCTGG
HISTH1ED_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGT CCGAGACTGCGCCTGC
HISTH1ED_K219_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTACT TTTTCTTGGCTGCCGCCT
RBMS2_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGC TGCTATCCGTGACTTCCAGG
RBMS2_K407_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTACT TGTTGAACTGGAAAGAATAGACCCC

Primer	Sequenz (5' → 3')
HDLBP_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGA GTTCCGTTGCAGTTTGGACCC
HDLBP_R1268_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTATC GTTTGGGGCCCCAAGG
SAFA_M01_GW_5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGA GTTCTCGCCTGTTAATGTAAAAAAG
SAFA_Y825_GW_3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCAAT AATATCCTTGGTGATAATGCTGACTC

Tabelle 43: Liste der verwendeten Sequenzierprimer

Primer	Sequenz (5' → 3')
DHX9_Seq1_5'	GCCTTACAAAGTAAACCTCTCTCAAGATTTAGAG
DHX9_Seq2_5'	CAGTATAATGTTTTGTACTGTAGGTGTGCTCC
DHX9_Seq3_5'	CCAGTTGGAGTAACCAAGGTTATTTTGTC
DHX9_Seq4_5'	GCAGAACACACTCTTAGAGAGCTTGATGC
hnRNPUL1_seq1_5'	GCCGTGTATGCTTCGAGATGAAGATC
hnRNPUL1_seq2_5'	GCAGGCCACCCAGTGCCTC
SAFA_Seq1_5'	GAACACTTCGATGACACAGTGGTTTGTC
SAFA_Seq2_5'	GCTAACTTTGAAAGTGATGAAGTAGAACTCTCG
LIG3_Seq1_5'	GTTTCGAAAGTTATGCGCCATGG
LIG3_Seq2_5'	GATGGAGAGCGAGTCCAGGTGC
Matrin3_Seq1_5'	GCATAACTATCATAAATTTGACAGTGAGTATGAGAG
Matrin3_Seq2_5'	CTATTACAGCTGGTAGAACCATTGAGTC
PANDAR_Seq_5'	ACGAATTCTTTCAGGAATGCCG
PANDAR_Seq2_5'	GTCTCTCTCAGCTTCCAGC
PANDAR_Seq_3'	GCAGTGGCTCACGCCT

Primer	Sequenz (5' → 3')
CMV_prom_Seq_5'	GCGGTAGGCGTGTACGGTG
BGH_term_Seq_3'	CAGGGTCAAGGAAGGCACG
pGEX_Seq_5'	GGCCTTTGCAGGGCTGGC
pGEX_Seq_3'	CCGGGAGCTGCATGTGTCAG
pDONR201_Seq_5'	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
pDONR201_Seq_3'	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
T7_prom_Seq_5'	CGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGC
T7_term_Seq_3'	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
eGFP_Seq_5'	ACATGGTCCTGCTGGAGTTC
eGFP_Seq_3'	AAAACCTCCCACACCTCCC
pAV_Seq_5'	CCACACCCTAACTGACAC
pAV_Seq_3'	CATATGGATATCGGTAAC

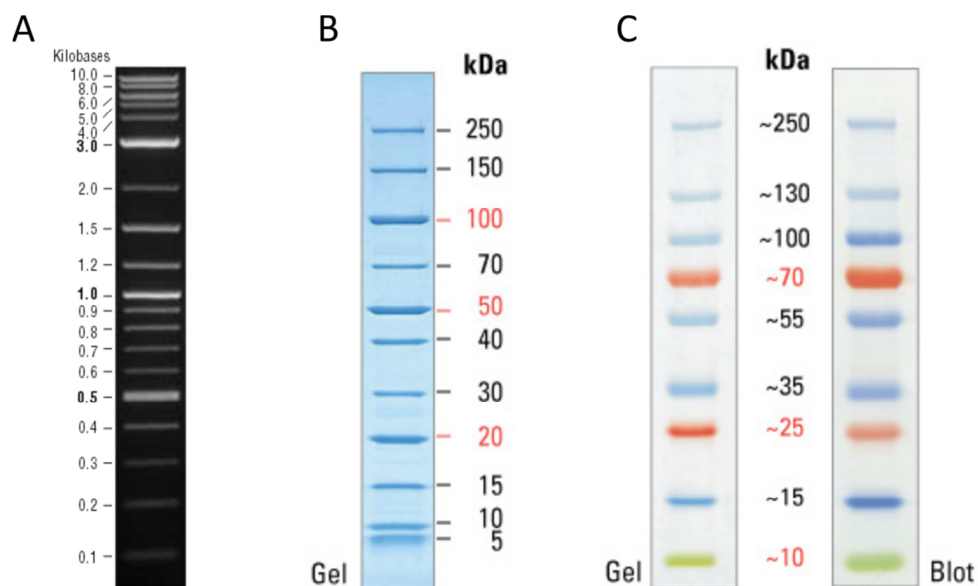


Abbildung 40: DNA- und Proteinmarker

A) 2-Log DNA Ladder (NEB), B) PageRuler™ Plus Unstained (Thermo Fischer), C) PageRuler™ Plus Prestained (Thermo Fischer)

11. Lebenslauf

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Identifizierung und Charakterisierung neuer Protein-Interaktionspartner der humanen lncRNA PANDAR“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Nicole Pospiech befürworte.

Essen, den _____
Name des wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen (Prof. Dr. Verena Jendrossek)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____
Unterschrift des Doktoranden (Nicole Pospiech)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____
Unterschrift des Doktoranden (Nicole Pospiech)